

75
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN EN LA FERMENTACIÓN
DEL POZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Norma Argelia Loaeza Chávez

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



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 está 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.

INDICE

CAPITULO I	INTRODUCCION	1
1.1	Maíz	1
1.1.1	Generalidades	1
1.1.2.	Estructura y composición	3
1.1.3.	Carbohidratos del maíz	5
1.1.4.	Proteínas de maíz	7
1.1.5	Nixtamalización	9
1.2.	Fijación de nitrógeno	14
1.2.1	Generalidades	14
1.2.2	Fijación biológica de nitrógeno	14
1.2.3	Fisiología de la fijación de nitrógeno	15
1.2.4	Tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno	16
1.2.5.	Efecto de factores externos	20
1.3	Alimentos fermentados	22
1.3.1	Generalidades	22
1.3.2.	Pozol	23
1.3.3.	Estudios bioquímicos	25
1.3.4.	Estudios microbiológicos	26
1.3.5.	Fijación de nitrógeno en pozol	27
1.3.6.	Productos fermentados de maíz	30
	OBJETIVOS	34

CAPITULO II	MATERIALES Y METODOS	35
2.1.	Materia prima	35
2.2.	Tratamiento del sustrato	35
2.3.	Fermentación	36
2.4	Toma de muestras	36
2.5.	Métodos Analíticos	36
2.5.1.	Análisis microbiológicos	36
2.5.1.1.	Bacteria mesófilas aerobias	37
2.5.1.2.	Bacterias lácticas	37
2.5.1.3.	Bacterias proteolíticas	37
2.5.1.4.	Bacterias fijadoras de nitrógeno	37
2.5.1.5.	Mohos y levaduras	38
2.5.2.	Análisis químico	39
2.5.2.1	Humedad	39
2.5.2.2.	Determinación de pH	39
2.5.2.3.	Acidez titulable.	39
2.5.2.4.	Determinación de cenizas	39
2.5.2.5.	Determinación de proteína cruda	40
2.5.2.6.	Determinación de proteína soluble	41
2.5.2.7.	Determinación de carbohidratos totales	41
2.5.2.8.	Determinación de azúcares reductores	42
2.5.2.9.	Determinación de ácidos grasos	42
2.6.	Análisis estadístico	43

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION 44

3.1.	Análisis microbiológico	44
3.1.1.	Bacterias mesófilas aerobias	45
3.1.2.	Bacterias lácticas	47
3.1.3.	Mohos y levaduras	49
3.1.4.	Microorganismos fijadores de nitrógeno	52
3.1.5.	Microorganismos proteolíticos	54
3.2.	Análisis químicos	57
3.2.1.	Humedad	57
3.2.2.	pH	59
3.2.3.	Acidez titulable	61
3.2.4.	Acidos láctico y acético	63
3.2.5.	Acido butírico	68
3.2.6.	Acido propiónico	68
3.2.7.	Proteína cruda	70
3.2.8.	Proteína soluble	72
3.2.9.	Proteína/cenizas	75
3.2.10.	Carbohidratos solubles totales	78
3.2.11.	Carbohidratos solubles reductores	80

CAPITULO IV CONCLUSIONES 83

4.	Conclusiones	83
----	--------------	----

1. INTRODUCCION

1

1.1. MAIZ

1.1.1. Generalidades.

México, como todos los países del mundo, tiene basada su cultura y su alimentación en un cereal: el maíz. Este es la base de su alimentación y se consume de diferentes formas en la dieta. En México el consumo de subproductos a base de este cereal es mayor de 120 Kg *per capita* anuales. En algunas poblaciones rurales de México y Centro América provee el 70% de las calorías y el 90% de las proteínas (Paredes et al 1983).

Se considera que el maíz es originario de América, su edad arqueológica se estima en 7,000 años según vestigios encontrados en el valle de México. Este cereal tiene una gran capacidad adaptativa, pudiendo llegar a crecer a temperaturas desde 10°C hasta 40°C. Actualmente se han realizado hibridaciones de este cereal para obtener variedades con mayor valor nutritivo y mejor rendimiento agrícola.

En los países occidentales se emplea principalmente para alimentación de ganado, aunque en Asia y Africa se destina para consumo humano (Salunkhe et al. 1985). Los principales países productores de maíz en el mundo son Estados Unidos, China e India. México ocupa el 5o lugar de producción a nivel mundial.

Botánicamente se ha clasificado en la familia de las gramíneas, clase monocotiledónea. Se han reportado cerca de 2000 especies y para propósitos generales todas las especies cultivables han sido clasificadas como *Zea mays* (Sarunkhe et al, 1985)

**Tabla 1.1 Distribución de los
constituyentes del grano de maíz.**

Componente	Proporción g/100 g	Almidón g/100 g	Proteína g/100 g	Grasa g/100 g	Cenizas g/100 g	Azúcar g/100 g
Total	100	72.4	9.6	4.7	1.47	1.94
Pericarpio	5.3	7.3	3.5	0.98	0.67	0.34
Punta	0.8	5.3	9.7	3.8	1.7	1.5
Germen	11.5	8.3	34.4	18.5	10.3	11.0
Endosperma	82.5	86.6	8.6	0.86	0.31	0.61

(Salunkhe, et al., 1982)

1.1.2 Estructura y composición.

En relación al tamaño el maíz es el más grande de todos los cereales. Físicamente, es un grano liso, con forma de cuña, más ancho en la cabeza que en la punta, su color puede variar desde blanco a amarillo rojizo y el peso del grano oscila entre 150 y 600 mg por grano.

Los cereales se caracterizan por presentar una relación baja de proteínas y alta de carbohidratos, principalmente almidón, dextrinas, pentosas y azúcares, (Pomeranz 1987).

Las principales partes anatómicas del maíz son: el pericarpio, el endospermo, el germen y la punta. Sus componentes químicos no se encuentran uniformemente distribuidos en las estructuras que lo forman, como se muestra en la Tabla 1.1.

Germen Es un tejido metabólicamente activo, compuesto por el embrión y el escutillio, que es una capa de células secretoras que forman el primer contacto entre el germen y el endospermo. El germen almacena nutrimentos y hormonas, que son activadas en estadios iniciales de la germinación. El germen es el principal depósito de lípidos del grano, conteniendo el 83% del total y está compuesto en su mayoría por triacilglicéridos. Contiene 70% de azúcar y 26% de las proteínas del maíz (la mayoría albúminas y globulinas). Es rico en minerales, contiene el 78% de los minerales del grano, siendo el principal el fósforo, como K_3PO_4 o ácido fítico, y también el azufre, como formador de los aminoácidos metionina y cisteína.

El endospermo Es la estructura más grande del grano, constituyendo del 82 al 84% en peso seco. está formado por la aleurona (2.2%), una porción externa de dos o tres capas de células (3.9%), otra porción cornea externa (58.1%) y un centro suave harinoso (17.8%). Contiene una gran proporción de almidón, poca proteína y casi no contiene lípidos.

El endospermo es un tejido de almacenamiento que contiene el principal componente del grano: el almidón, formado por amilosa y amilopectina en una relación de 23:73; se han encontrado lípidos y proteínas asociados al almidón y azúcares en baja proporción (1% en base seca). Contiene el 74% de la proteína total del maíz, la mayoría son proteínas insolubles de almacenamiento, principalmente zeína y glutelina. La alta proporción de la fracción zeína pobre en lisina es la causa de que la proteína del maíz presente una deficiencia en lisina y triptofano.

La aleurona, capa exterior del endospermo cubre el almidón y el germen, esta constituida por células ricas en minerales y proteínas (19.2%) de alta calidad pero no son disponibles a las enzimas digestivas.

Pericarpio o cáscara. Es la estructura exterior de la semilla, es delgada, transparente y esta formada por células muertas (Wolf et al 1952b citado por Watson 1987).

Comprende el epidermis, el mesocarpio y los tubos celulares. Su función es proteger a la semilla de ataques externos. Está constituido principalmente por carbohidratos insolubles. Sandstead et al. (1978) encontraron en el pericarpio 70% de

hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina, en base seca y contiene el 80% del total de la fibra del maíz.

Extracciones térmicas con álcali provocan un incremento del polisacárido homogéneo xilano-arabano, aparentemente formador de la estructura celulósica de la pared celular y de un péptido formado de 17 aminoácidos, hexosamina e hidroxiprolina. Este mucopolisacárido forma parte integral de la pared celular de la matriz.

1.1.3. Carbohidratos del maíz.

Los carbohidratos son los principales constituyentes químicos del maíz, se encuentran en el endospermo como tejido de almacenamiento, formando el almidón el 72% del total del grano.

Se encuentran en el maíz carbohidratos simples, carbohidratos complejos estructurales y carbohidratos complejos de almacenamiento.

Los carbohidratos simples son: monosacáridos, principalmente D-glucosa y D-fructosa que se presentan en proporciones iguales. (1.7 mg/grano maduro) Estos azúcares reductores forman el 0.4% del grano en peso seco. Disacáridos como la sacarosa, que forma el 4-8%, y la maltosa el 0.4% del total de los azúcares y algunos oligosacáridos en poca proporción (Boyer 1987). Se han encontrado también fitatos depositados en los cuerpos proteínicos de la aleurona y del escutillio 0.9% (peso seco).

Los carbohidratos complejos estructurales están constituidos principalmente por polisacáridos como la celulosa, la hemicelulosa y sustancias pécticas. Las fibras de celulosa son la base estructural de las paredes celulares de todas las plantas. Es un

homopolímero de D-glucosa con uniones $\beta(1-4)$ formados por 10,000 unidades de glucosa (Aspinall, 1982). La fibra de la cáscara contiene 23% de celulosa, 70% de hemicelulosa y 0.1% de lignina. La hemicelulosa del pericarpio contiene 54% de xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucónico. (Wolf et al. 1953). Debido a su heterogeneidad, las hemicelulosas son menos cristalinas y mucho más solubles que la celulosa, pudiéndose extraer mediante soluciones alcalinas (Braverman, 1970). Se ha reportado que la pared celular contiene arabinogalactosa, xiloglucanos, arabinosas e hidroxiprolina.

De acuerdo con Boyer (1987) de los carbohidratos complejos de almacenamiento el almidón es el principal polímero que funciona como almacén de energía del maíz. Está formado por dos glucópolímeros: amilosa (25-35%), molécula lineal de glucosa con uniones $\alpha(1-4)$ y amilopectina (70-75%) molécula de glucosa con uniones $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$. Se han reportado asociados a los gránulos de almidón ácidos grasos libres, lisofosfolípidos y proteínas (se han detectado 4 diferentes polipeptidos).

Se ha encontrado que algunos polisacáridos solubles en agua se forman durante el desarrollo del grano (2% en peso seco); en algunas variedades dulces llegan a constituir hasta el 35% en peso seco. Se ha determinado que esta fracción soluble contiene cadenas de polisacáridos llamados fitoglucanos que están constituidos por un $\alpha(1-4)$ -glucano con uniones $\alpha(1-6)$. Se ha sugerido que estos fitoglucanos son precursores del polímero amilopectina del almidón (Boyer, 1987).

1.1.4. Proteínas del maíz.

7

El contenido total de las proteínas del maíz puede variar desde 8% hasta 18.2%. Están constituidas principalmente por albúmina (7%), globulinas (10%), zeína (39%) y glutelinas (35%).

La clasificación y distribución de las proteínas del maíz se muestra en la Tabla 1.2.

La albúmina, globulina y glutelina se encuentran en el germen, en tanto que la zeína y glutelina están concentradas en el endospermo. Un alto contenido de proteína en el maíz se asocia usualmente con un alto contenido de zeína en el endospermo.

La proteína del maíz es deficiente en lisina y triptofano. Esta deficiencia ha sido atribuida principalmente a la alta proporción de zeína (fracción proteínica baja en lisina). Además la cantidad excesiva de leucina provoca que exista una desproporcionada relación de leucina/isoleucina 18.7:3.8 (Gapalan y Kamala, 1975), lo cual ocasiona un efecto antagónico en la utilización de isoleucina.

El valor biológico de la proteína del maíz es 37% con respecto a la del huevo (100%).

TABLA 1.2 DISTRIBUCION Y CLASIFICACION DE LAS FRACCIONES PROTEINICAS DEL GRANO DE MAIZ, ENDOSPERMO Y GERME

FRACCION PROTEINICA	FRACCION DE ACUERDO AL SOLVENTE EMPLEADO	GRANO TOTAL	ENDOSPERMO	GERMEN
Nitrogeno no proteico.		6	3	28
Albumina	1-0.5 M NaCl	7	3	35
Globulina		5	3	18
Total		18	9	72
Zeína-I	II-55% Isopropanol	42	48	4
Zeína-II	III- Con II + 0.5% de mercaptoetanol (ME)	10	12	1
Prplamina Total		52	60	5
Glutelina-2	IV-buffer pH 10 + 0.6% ME	8	9	3
Glutelina-3	U-con IV + 0.5 (SDS) dodecilsulfato de sodio	17	17	15
Glutelina total		25	26	18
Residuo		5	5	4
Proteína total (% de todo el grano)		100	78	18
Peso seco (% de todo el grano)		100	88	13

(modificado de Wilson, 1987)

Expresado como g/100 g de maíz

1.1.5. Nixtamalización.

Nixtamalización, proveniente del náhuatl: *Nexitli*, que significa cenizas o cenizas de cal y *tamalli*, harina de maíz, es un tratamiento térmico alcalino que consiste en hervir el maíz en soluciones acuosas de Ca(OH)_2 . Ha existido en México desde la época de las culturas prehispánicas. Probablemente las antiguas culturas latinoamericanas emplearon este método con el único fin de ablandar e hinchar el grano de maíz para facilitar la molienda; sin embargo se sabe que algunos grupos étnicos como los Tarascos molían el maíz con bicarbonato para prevenir la constipación y otros lo daban como alimento a los enfermos. Estudios antropológicos (Katz et al., 1974) concluyen que los pueblos que practicaron este proceso mostraron un mejor desarrollo.

Cambios nutritivos.

Durante este proceso se llevan a cabo importantes cambios en el valor nutritivo. Se han reportado pérdidas de tiamina, niacina, riboflavina, y carotenos; aumento de fósforo, y fierro (15 y 13% respectivamente) y el calcio aumenta 2010% (Cravioto 1956).

Se ha comprobado por medio de estudios biológicos, que este tratamiento incrementa el valor nutricional del maíz (Cravioto et al 1952), ya que aumenta la relación de lisina 2.8 veces, los aminoácidos esenciales incrementan al doble, la relación leucina-isoleucina aumenta 1.8 veces, en tanto que el triptofano aumenta ligeramente. Esto se traduce en un incremento de aminoácidos disponibles. Se presenta, asimismo, una liberación de

niacina que justifica la ausencia de polagra en México (Katz, 1974).

Estos cambios se han atribuido a una separación completa o parcial de las estructuras de maíz y de los nutrimentos contenidos en ellos, así como al hecho de que el resto de las estructuras estén expuestas a posteriores acciones físicas y químicas.

Cambios en proteínas.

La nixtamalización puede provocar reacciones de desnaturalización en las proteínas por desestabilización de la estructura terciaria, causada por la eliminación de interacciones electrostáticas entre los grupos carbonilo y amino, e hidrólisis de los enlaces peptídicos, produciéndose péptidos de menor peso molecular.

Sánchez Mejorada (1982) reportó que el tratamiento del maíz con cal en una concentración del 2% y con 14 horas de reposo, provoca una pérdida de 8.38% de sólidos y de 0.2 gramos de proteína cruda por 100 gramos de maíz. Observó que se extraen menos albúminas y globulinas en el maíz nixtamalizado en comparación con las prolaminas y glutelinas, que no varían su extracción entre el maíz nixtamalizado y sin tratamiento. Análisis electroforéticos de las diferentes fracciones proteínicas mostraron que las únicas afectadas por el tratamiento térmico alcalino fueron las albúminas y las globulinas. Se consideró que el tratamiento provoca reacciones de adición por unión de dos o más proteínas o péptidos, o por el hecho de que el calcio presente tiene la capacidad de aglomerar proteínas, particularmente la albúmina; las globulinas únicamente sufrieron reacciones de hidrólisis.

Se ha reportado la formación de nuevos aminoácidos como la lisinoalanina (LAL) en maíz sometido a tratamiento alcalino Sanderson et al (1978), Tovar y Carpenter (1982), Sternberg et al (1975). En el caso del maíz nixtamalizado se ha observado que la LAL es inestable en álcali; su formación aumenta hasta que el valor de pH es de 12.5 después del cual comienza su destrucción (Sanchez Mejorada, 1982). Es posible que la nixtamalización provoque cambios en las proteínas (reacciones de adición, racemización de algunos aminoácidos) que resulten en una mayor resistencia al ataque proteolítico (Hayashi y Kameda, 1980; Friedman et al., 1981)

Como ya se mencionó el maíz es deficiente en los aminoácidos esenciales lisina y triptofano y tiene una mala relación leucina-isoleucina, lo que afecta el paso de triptofano a niacina. (Sternberg, 1975). Con la nixtamalización se mejora la calidad proteínica del maíz debido a que el calcio interacciona con los enlaces disulfuro y fuerzas de atracción no covalente de la fracción glutelina del grano, produciendo un desdoblamiento de proteínas. De esta manera aumenta la disponibilidad de lisina, en tanto que la fracción zeína (deficiente en lisina y triptofano) se hace menos digerible. Wall y Paulis (1978) sugieren que la mejora en la digestibilidad del maíz puede ser debida a una mayor accesibilidad de las proteínas, causada por la gelatinización del almidón de maíz y a cambios en la proteína matriz.

La capa de aleurona que mantiene encerrado al endospermo y al germen contribuye a la reducción de la pérdida de proteína durante la nixtamalización (Paredes-López, 1981); la mayoría de las

proteínas lixiviadas son albúminas y globulinas de bajo peso molecular (Paredes-López y Saharópulos, 1981).

Cambios en carbohidratos.

El tratamiento alcalino a bajas concentraciones de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ causa isomerización en los monosacáridos, conforme aumenta la concentración pueden llegar hasta β -eliminación o a reacciones de oxidación. Se ha observado que el poder reductor de los azúcares aumenta cuando se someten a condiciones alcalinas severas.

El alcali disuelve fracciones de las paredes celulares del pericarpio, facilitando su separación, por el debilitamiento de beta-glucanos (Aspinal, 1980). Esto ocasiona la principal pérdida física durante el proceso, aproximadamente 8-12% de sólidos (Pflugfelder, 1988 citado por Gómez et al 1989).

El tratamiento del almidón con alcali provoca la liberación de los granulos de la matriz por la dispersión y desintegración de ésta. Así se presenta una hinchazón y una destrucción parcial de los granulos de almidón, debida a su hidratación y gelatinización. De esta manera, la pérdida de almidón es de 10.8% (González de Palacios, 1980). Es importante mencionar que a valores de pH mayores de 7 la temperatura y tiempo de gelatinización del almidón disminuye (Boundy et al 1987).

La pérdida física de los componentes del maíz depende de las condiciones de nixtamalización, como el tiempo de cocimiento, la concentración de cal y el tiempo de reposo, llegando a obtenerse pérdidas de sólidos desde 5.3% hasta 14.2%

Molienda del nixtamal.

La fricción producida en la molienda provoca una gelatinización adicional del almidón. Esto favorece la obtención de la masa constituida por fracciones de pericarpio, germen y piezas periféricas del endospermo; gránulos libres de almidón y almidón soluble; la proteína aparenta contribuir a la integración de la masa por formación de láminas que circundan o rodean al almidón, aunque algunas de las cohesiones pueden ser debidas a la amilosa y la amilopectina.

Cuando se muele maíz que no ha sido sometido al tratamiento alcalino no se produce el rompimiento adecuado de la estructura del grano que es necesaria para la total integración de la masa y para lograr una distribución uniforme, solubilización y adhesión de los gránulos de almidón, las proteínas, la pared celular y los lípidos.

La masa contiene 52-54% de humedad, 12-25% de piezas de germen y endospermo, 19-31% de gránulos libres de almidón y fragmentos de paredes celulares, 3-4% de sólidos dispersos y lípidos solubles. (Gómez,1989).

1.2. FIJACION DE NITROGENO.

1.2.1. Generalidades.

El nitrógeno constituye el 78.0% del aire, en donde se encuentra en forma de gas diatómico. Es inerte, debido a que su enlace químico le proporciona gran estabilidad. La transformación del nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado se conoce como fijación de nitrógeno, existen tres vías para llevarse a cabo:

1. *Fijación espontánea.* Esta es provocada por descargas eléctricas, truenos y combustión.

2. *Fijación industrial.* Producida por el proceso industrial de Haber-Bosch para producción de fertilizantes nitrogenados.

3. *Fijación biológica.* Efectuada principalmente por organismos procariotes como bacterias, actinomicetos y cianobacterias.

1.2.2. Fijación biológica de nitrógeno.

Las dos terceras partes de la fijación de nitrógeno en la naturaleza se efectúan por esta vía, la cual es llevada a cabo principalmente por organismos procariotes.

Este proceso consiste esencialmente en la reducción de nitrógeno molecular a amoníaco bajo condiciones de presión y temperatura fisiológicas.

La fijación biológica de nitrógeno puede llevarse a cabo por organismos de vida libre o simbióticos.

1.2.3. Fisiología de la fijación de nitrógeno.

La reacción general de la fijación de nitrógeno y su sistema enzimático (nitrogenasa) son similares en todos los fijadores de nitrógeno:



Los participantes en la reacción son el nitrógeno, un donador de electrones, ATP, ferredoxina reducida, fuente energética e hidrógeno. En el caso de microorganismos anaerobios el donador de electrones es el formato, el hidrógeno molecular y el piruvato; en tanto que en los microorganismos aerobios los electrones se originan en el ciclo de ATC, participando también el ATP y Mg^{++} . Se ha propuesto que el ATP funciona como fuente de protones, como activador de electrones o como un inductor de cambios conformacionales de la nitrogenasa (Rose, 1977).

La enzima que cataliza este proceso es la nitrogenasa, la cual está formada por dos metaloproteínas (ferroproteína y proteína Mo-Fe). Este sistema, que cataliza un proceso reductor, es sensible irreversiblemente al oxígeno. La enzima puede funcionar en las bacterias aerobias gracias a los mecanismos de protección de su conformación mediante los cuales se hace insensible al oxígeno. El microorganismo protege a la enzima eliminando al oxígeno por actividad respiratoria, de esta forma se mantiene catalíticamente activa (Rose, 1977).

1.2.4. Tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno.

En la Tabla 1.3. se presenta una clasificación de microorganismos fijadores de nitrógeno.

Microorganismos simbióticos.

Los microorganismos simbióticos solo fijan nitrógeno cuando se encuentran en nódulos o en raíces de plantas huéspedes específicas. Un ejemplo de éstas es *Rhizobium*, bacteria Gram negativa, que infecta las raíces de las leguminosas formando nódulos los cuales son capaces de convertir nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. Esta simbiosis leguminosa-*Rhizobium* es de gran importancia en agricultura ya que provoca el incremento de nitrógeno combinado en el suelo. Esto hace posible el crecimiento de leguminosas en suelos donde otras plantas, que no son capaces de fijar nitrógeno, no puedan crecer.

Las cianobacterias se asocian con grupos de plantas en fijación de nitrógeno simbiótico, aunque en casi todos los casos estos microorganismos pueden crecer y fijar nitrógeno independientemente del huésped (MarecKová, 1983).

De esta manera existen dos tipos de asociación simbiótica entre bacterias y plantas superiores: simbiosis asociativa o rizocoenosis y simbiosis obligatoria.

La fijación de nitrógeno en los organismos simbióticos, se mantiene por más de cuatro semanas, la cantidad de nitrógeno fijado es de 1.0-2.5 g de nitrógeno por gramo de material celular, siendo durante la fase estacionaria cuando se presenta,

MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

I - FIJADORES LIBRES.

(Tabla 1.3.)

AEROBIOS

Heterótrofos

Fotosintéticos

Bacterias:

Cianobacterias

Azotobacter

(varias especies pero

Klebsiella

no todas)

*Beijerinckia**Mycobacterium flavum**Spirillum lipoferum*

ANAEROBIOS

Heterótrofos

Fotosintéticos

Bacterias

Bacterias

*Clostridium**Chromatium**Desulfotribrio**Chlorobium**Rhodospirillum**Rhodopseudomonas**Rhodomicrobium*

II - FIJADORES SIMBIOTICOS

Plantas leguminosas

Plantas no leguminosas

Soya, chícharo,

Alnus, Myrica, Ceanothus

trébol, etc., en

Comptonia; en asociación

asociación con

con actinomicetos del

bacterias del

género *Frankia*.género *Rhizobium*.Pasto: *Azospirillum lipoferum*

(Brock., et al., 1984)

Microorganismos de vida libre.

En este grupo están presentes bacterias aerobias, anaerobias o anaerobias estrictas: *Azotobacter*, *Clostridium* y *Desulfohalobium*, que habitan en las raíces de plantas superiores; ciertos *Bacillus* anaerobios facultativos, que fijan nitrógeno solo bajo condiciones anaerobias; las bacterias fotosintéticas que viven principalmente en medio acuoso y las cianobacterias, que por su resistencia a temperaturas extremas y a la desecación son adaptables a un amplio rango de condiciones ambientales (Marecková, 1983).

En este grupo de microorganismos la fijación de nitrógeno sólo ocurre en células en crecimiento, en las que el nitrógeno fijado se convierte en proteína celular. Cuando la fase de crecimiento ha sido superada se acumulan compuestos nitrogenados solubles, como amoníaco, el cual suprime la fijación. A causa de esto el tiempo de vida en el que se lleva a cabo es de unas cuantas horas, pero a pesar de esto la actividad específica de fijación de nitrógeno es mayor que en los organismos de vida simbiótica. la cantidad de nitrógeno fijado es de 0.1 g de nitrógeno por gramo de material celular (Mulder, 1975).

Su eficiencia es menor que la de los simbióticos debido a que por estar en crecimiento los compuestos son usados para la síntesis de material celular y las bacterias aerobias de existencia libre requieren carbono para excluir el oxígeno de la nitrogenasa.

Crecimiento asociativo de microorganismos fijadores de nitrógeno con otros microorganismos.

A los microorganismos fijadores de nitrógeno que presentan mayor actividad cuando crecen en en asociación que cuando crecen en cultivo puros se les denominan fijadores de nitrógeno facultativos simbióticos. Es probable que en estas asociaciones de microorganismos se facilite la disponibilidad de sustrato o de oligoelementos para los fijadores de nitrógeno. Se ha observado que las colonias de hongos estimulan fuertemente el crecimiento bacterial alrededor de ellas, por otra parte existe evidencia de sustancias promotoras de crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en ciertos hongos. Las condiciones necesarias para el crecimiento de fijadores de nitrógeno puede crearse eliminando sustancias tóxicas presentes en el medio original o producidas como subproductos por ellas mismas. (Jensen y Holm, 1975).

Se ha observado que la presencia de bacterias lácticas en cultivos de *Azotobacter chroococum*, favorece la fijación de nitrógeno como lo muestran estudios realizados por Muñoz y Viniegra (1981). La presencia de lactato producido por *Lactobacillus bucheri* permitió crecer a *Azotobacter chroococum* con proporciones altas de aereación. Los autores suponen que esto es debido a que se presenta un balance entre la producción de aire suministrado y la reducción metabólica de coenzimas (NAD o NADP) para poder obtener el óptimo de fijación de nitrógeno ya que el lactato puede proporcionar un mejor balance de NAD reducido por cada ATP con respecto a la glucosa. Suponen que es factible

acoplar la fermentación láctica con la fijación biológica de nitrógeno mediante inoculación secuencial de medios azucarados siendo de esta manera una alternativa para incrementar la eficiencia de la fermentación de alimentos tradicionales.

1.2.5. Efecto de factores externos.

La fijación de nitrógeno es inhibida por el óxido nitroso, óxido nítrico, cianuro, azida, y acetileno. Así también las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se ven afectadas por la nutrición mineral, oxígeno y nitrógeno combinado, especialmente por iones amonio.

En lo referente a la nutrición mineral el más importante es el molibdeno, ya que sin la cantidad adecuada de este mineral no se presenta fijación de nitrógeno; el vanadio puede ser sustituto del molibdeno en algunas bacterias de vida libre. En relación al hierro es menor su requerimiento, el potasio es esencial para el crecimiento de bacterias de vida libre pero no para la fijación de nitrógeno; el magnesio sólo es necesario para algunos microorganismos, como cofactor de reacciones enzimáticas necesarias para la fijación de nitrógeno.

Con respecto al oxígeno, es necesario para las bacterias aerobias, pero un exceso provoca reducción de la actividad de la nitrogenasa debido a la oxidación de los reductores necesarios y a la sensibilidad de la nitrogenasa. En el caso de los fijadores de nitrógeno anaerobios la presencia de oxígeno inhibe la actividad enzimática.

La presencia de nitrógeno combinado como amoníaco reprime la síntesis de la nitrogenasa, sin afectar el crecimiento microbiano. En *Clostridium butyricum* no se presenta este efecto, puede fijar nitrógeno en presencia de amonio.

1.3. ALIMENTOS FERMENTADOS

1.3.1. Generalidades.

Los alimentos fermentados se definen como aquéllos que han estado expuestos a la acción de microorganismos o enzimas con el fin de provocar cambios bioquímicos que causen modificaciones deseables, pudiendo ser cambios organolépticos, de digestibilidad o de valor nutritivo (Campbell-Platt, 1987). Se considera a la fermentación como un proceso de conservación de alimentos relativamente eficiente con bajo costo energético; el tipo de alimento fermentado refleja la dieta de la región en algunos casos estos le proporcionan diversidad.

Los alimentos fermentados tradicionales solo son regionales y no se conocen fuera de su lugar de origen, forman parte fundamental en la dieta de grupos étnicos (Hasseltine, 1979). Se considera que el origen de los alimentos fermentados fue accidental, en la cultura China se menciona su presencia desde hace 7000 años (Wang, 1988) en la elaboración de bebidas alcohólicas y se ubica en la misma época la elaboración del pan atribuida a los egipcios.

1.3.2. Pozol.

Siendo el maíz la base de la alimentación de los mexicanos la mayoría de los alimentos fermentados tradicionales se elaboran a partir de este cereal, como es el caso del *pozol*.

Pozol, posol, pozole, del náhuatl "pozolli" espumoso (Robelo, 1948). Es una bebida refrescante elaborada a base de maíz fermentado, se consume como alimento básico por algunos grupos indígenas del sur y sureste de México: chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolobabes, nanes, zoques y zapotecos.

Su forma de preparación tradicional no ha sufrido modificaciones, se elabora en forma doméstica para consumo familiar o en mayor cantidad para ser vendido en el mercado. Se limpia el maíz, se nixtamaliza hirviéndolo en una solución acuosa de Ca(OH)_2 hasta que se desprende la cascarrilla, posteriormente se deja remojar a temperatura ambiente los granos, después de lo cual se friccionan entre ellos para favorecer el desprendimiento de la cáscara y se enjuaga varias veces desechando el agua de lavado. Así se obtiene el nixtamal, el cual se muele en metate o molino. Con la masa obtenida se forman bolas de tamaño variable según la región, se envuelven en hojas de plátano (*Musa spp*), platanillo (*Heliconia spp*) u hoja blanca (*Catalpa hulea Aubl. Mey*) con el objeto de reducir la desecación. Generalmente se dejan fermentar durante 4 o 8 días, aunque algunos grupos como los lacandones o chamulas lo dejan más de 2 semanas y lo consumen ya enmohecido. (Cruz Ulloa y Ulloa, 1973)

Esta masa fermentada es suspendida en agua y esta bebida se consume sola o adicionada de sal, azúcar, miel o chile seco molido (*Capsicum annuum* L).

Cuando se le añaden semillas de cacao molido a la masa antes de fermentar se le denomina chorote. Poblaciones como los lacandones o chamulas lo consumen varias veces al día, durante sus jornadas en la selva llevan bolas de pozol como provisión. Los mayas lo emplean en el control de infecciones como cataplasma en heridas, (se han aislado del pozol *Penicillium claviforme* y *Trichoderma viridae* que tienen propiedades antibióticas). Se emplea también en afecciones intestinales y para disminuir la fiebre en los enfermos (Cruz Ulloa y Ulloa 1973) mezclado con agua y miel de abejas. Estos usos se respaldan en el hecho de que se ha encontrado determinado efecto antagónico de algunos microorganismos del pozol, como *Agrobacterium azotophilum*, sobre varias bacterias y hongos patógenos para el hombre (Ulloa y Herrera, 1982).

El pozol se emplea también con fines ceremoniales, los mayas lo utilizan como ofrenda en diversas festividades relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz (Salinas, 1958).

1.3.3. Estudios bioquímicos.

Debido a su importancia cultural y nutritiva se han realizado estudios sobre el pozol, el primero lo efectuaron Cravioto y colaboradores en 1959. Este trabajo consistió en un análisis químico comparativo entre el pozol y los granos de maíz utilizados en su preparación. Reportaron que el pozol contiene menos tiamina, fibra cruda y fósforo que el maíz debido al tratamiento alcalino y posterior eliminación del pericarpio; mayor cantidad de riboflavina, niacina, lisina, y triptófano debido a la actividad microbiana. Al efectuar estudios nutricionales en ratas determinaron que el valor biológico de las proteínas se incrementó. Reportaron un incremento de 45% en el contenido de nitrógeno total de la masa fermentada, lo cual se atribuyó posteriormente a procesos de fijación de nitrógeno atmosférico (Ulloa et al., 1987).

Leal y colaboradores (1987) corroboraron el incremento de proteína durante la fermentación del pozol y consideraron que este aumento es debido a fijación de nitrógeno atmosférico por actividad microbiana. Evaluaron la fijación de nitrógeno por incremento en la relación proteínas/cenizas y encontraron que este incremento depende de la concentración de proteína inicial, el tipo de fuente de nitrógeno, la presencia o ausencia del tratamiento térmico alcalino, el tipo de inóculo y del tipo de sustrato amiláceo. Aguilera (1989) también reportó un incremento de proteína tanto cruda como soluble durante la fermentación del pozol y por análisis cromatográficos concluyó que en el pozol se presenta una fermentación combinada láctica-acética-alcohólica-butírica.

1.3.4. Estudios microbiológicos.

La flora microbiana que se presenta durante la fermentación del maíz es mixta debido a que su elaboración no es controlada. La fermentación del pozol es espontánea, pero a pesar de esto se observa una tendencia uniforme en su microbiota. Se ha encontrado que en el inicio de la fermentación predominan las bacterias principalmente lácticas las cuales deben ser las responsables de la producción de la mayoría de la acidez y en las etapas finales levaduras y mohos.

Con respecto a la presencia de bacterias en los aislamientos microbianos se reportaron inicialmente: *Bacillus cereus*, *Paracolobactrum aerogenoides*, *Escherichia coli* var. *neapolitana*, *Pseudomonas mexicana*, *Klebsiela pneumoniae*, *Agrobacterium azotophilum* y *Acromobacter pozolis* (Ulloa y Herrera, 1976-1982). Nuradia (1988) reportó que predomina *Leuconostoc spp* y también se encuentran *Lactobacillus spp* heterofermentativa y especies de *Streptococcus*, que se presentan posteriormente.

Se han aislado entre los hongos *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y especies de *Candida* a las pocas horas de fermentación, en tanto que los mohos *Cladysporium cladosporoides*, *Cl herbarum*, *Monilia silofila* y *Hucor rouxianus* aparecen en etapas posteriores cuando el pH a disminuido y la superficie se va secando. También se han aislado *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum spp*, *Fusarium spp*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viridae*, *Penicillium claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. lanoso-viridae* y *Phialophora richardsiae* (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

La presencia de sustancias antifungales producidas por *A. azotophilum* y/o otros microorganismos que crecen en el pozol puede explicar el que los mohos no invadan las bolas de pozol durante las primeras 24 horas de fermentación.

Las levaduras que se han aislado del pozol son *Candida krusei*, *Trichosporon cutaneum*, *Hansenula fabiani*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida guilliermondii*, *C. parapstilis*, *C. tropicalis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Estudios realizados por Ramírez (1987) empleando sustrato estéril bajo condiciones controladas mostraron que en fermentaciones de la masa de nixtamal inoculada con un cultivo mixto de pozol se presenta una fermentación láctica durante los primeros tres días y en los siguientes, el autor infiere que debe existir una interacción compleja de la flora provocando cambios organolépticos y aumento en la concentración de niacina.

1.3.5. Fijación de nitrógeno en pozol.

De los alimentos fermentados tradicionales fue en el pozol en donde se observó por primera vez la fijación de nitrógeno, (Taboada et al., 1971) posteriormente se reportó en tesgüino y en pulque (Herrera et al., 1972)

Del pozol se han aislado dos bacterias capaces de fijarlo en cultivos puros o mixtos: *Agrobacterium azotophilum* y *Klebsiella pneumoniae* (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Con respecto a los microorganismos fijadores de nitrógeno, Aguilera (1989) reportó que este es el último grupo que se presenta durante la sucesión microbiana, se detectan a los 3 días y alcanzan su máximo crecimiento a los 12 días de fermentación.

Contrariamente a lo esperado, cuando Aguilera (1989) inoculó masa de maíz nixtamalizado con *A. Azotophilum* obtuvo la menor fijación de nitrógeno, en comparación con las fermentaciones inoculadas con flora mixta de pozol, con yogurt, y sin inocular, a pesar de que se presentó la mayor cuenta microbiana de microorganismos fijadores de nitrógeno. En base a lo anterior concluye que la fijación de nitrógeno no depende únicamente de la presencia de los microorganismos fijadores de nitrógeno sino que debe existir una interacción compleja de los microorganismos presentes en la microbiota del pozol.

Aguilera (1989) reportó que la fermentación de pozol inoculada con yogurt presenta una mayor cantidad de nitrógeno fijada comparando con los otros inóculos y con la fermentación natural, esto corrobora lo reportado por Muñoz y Viniegra (1981) los cuales atribuyen a la fermentación láctica un efecto positivo sobre los microorganismos fijadores de nitrógeno.

En relación al efecto de aminoácidos se ha observado que la presencia de isoleucina y D-metionina favorecen la fijación de nitrógeno de *Agrobacterium azotophilum* y que concentraciones de 0.002 mM de ácido glutámico y 0.001 mM de ácido aspártico la estimulan, mientras que mayores concentraciones la inhiben, un medio mínimo de cultivo libre de nitrógeno (Taboada y Herrera, 1972). Por otra parte Leal et al., (1987) reportaron que la cantidad inicial de proteína presente en el sustrato influye en la fijación de nitrógeno, encontrándose que al aumentar el contenido inicial de proteína se presenta una mayor fijación de nitrógeno. En relación a la fuente de nitrógeno se observó que al emplear fuentes proteínicas (caseína, peptona de soya, harina de maíz y

gallinaza) se obtiene un mayor aumento, comparando con fuentes no proteínicas (sulfato de amonio y urea) y empleando urea la proteína no aumenta (Alvarez y López, 1987).

Como ya se mencionó anteriormente estudios realizados por Muñoz y Viniogra (1985) efectuados con *Azotobacter chroococcum* señalan que la fijación de nitrógeno depende de las fuentes de carbono empleadas, encontraron que empleando lactato de calcio o de litio se presenta mayor actividad que al emplear glucosa o acetato de sodio para su crecimiento en medios de cultivo sin fuente nitrogenada, ellos concluyen que el lactato favorece la actividad de los microorganismos fijadores de nitrógeno.

Por otra parte Taboada y colaboradores (1975) reportaron que con cultivos separados y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum*, empleando diferentes fuentes de carbono se estimula la fijación de nitrógeno únicamente cuando se incluye maíz en el sustrato. Ellos observaron que al inocular estos microorganismos juntos aumentó al doble la fijación de nitrógeno comparado con cultivos puros por lo que deducen que en este fenómeno se presenta un sinergismo microbiano, al emplear otras fuentes de carbono obtuvieron mejores resultados usando maltosa y galactosa. Leal y colaboradores (1987) corroboraron empleando *Agrobacterium azotophilum* que solo se presenta fijación de nitrógeno cuando esta presente maíz como componente del sustrato.

1.3.6. Productos fermentados de maíz.

En la Tabla 1.4. se presenta una lista de alimentos fermentados mexicanos cuyo sustrato es el maíz, la mayoría de éstos son líquidos, únicamente el pozol es sólido.

Por otra parte en Africa se conocen por lo menos 20 diferentes productos fermentados de maíz, pero en ninguno de estos se somete el maíz al tratamiento térmico alcalino. Dentro de estos se encuentran: el Kenkey, Akasa, Koko, Banku, Abele, Ogi, Kenyan Uji, Maheu o Mahewu y Koko.

La elaboración de estos alimentos sigue básicamente los mismos lineamientos que en el pozol: el maíz se remoja en agua, se muele y se mezcla con agua para elaborar una masa, en el caso de el Banku, Kenkey, y Akpler la masa obtenida se deja fermentar de 1 a 3 días. En el caso del Ogi la masa se diluye, se tamiza y se filtra para una posterior fermentación. En la mayoría de los casos la masa fermentada se concentra por cocción hasta llegar a una especie de papilla o torta.

En estos alimentos se ha encontrado que *Corynebacterium spp* hidroliza el almidón e inicia la acidificación; después es remplazado por *Aerobacter cloacae*. La alta acidez se atribuye principalmente al ácido láctico producido por *Lactobacillus plantarum*. En el inicio del periodo de acidificación *Saccaromyces cerevisiae* prolifera rápidamente y la final predomina *Candida mycoderma*, se considera que estos dos microorganismos contribuyen al olor y enriquecimiento de vitaminas del producto. *Aerobacter cloacae* provoca la disminución de tiamina y de ácido pantoténico, pero incrementa el contenido de riboflavina y niacina.

TABLA 1.4 ALIMENTOS FERMENTADOS A BASE DE MAIZ

Alimentos fermentados mexicanos elaborados a base de maíz		
Nombre	Elaboración	Estado
Agua agria	Bebida no embriagante preparada con maíz molido mezclada con agua.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Ixtapalapa, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.
Atole	Bebida no embriagante preparada con masa de maíz molido o tostado, o con tortillas y escobajos de mazorcas quemadas y molidas	Abarca los mismos Estados de Agua Agria.
Atole agrio	Bebida no embriagante preparada con masa agria mezclada con maíz blando y molido. (La masa agria se prepara con maíz negro fermentado durante 5 días)	Abarca los mismos Estados de Agua Agria.
Cuarapa	Bebida embriagante preparada con zumo de caña de maíz	Puebla: Tehuacán
Charagua	Bebida no embriagante elaborada a base de pulque rezagado, con algíbar, chile y hojas de maíz tostadas	Abarca los mismos Estados de Agua Agria.
Ostoche	Bebida embriagante elaborada a base de jugo de caña de maíz y pulque o panocha	D.F., Estado de México.
Quebranta huesos	Bebida embriagante elaborada con zumo de caña de maíz verde y maíz tostado machacado con jugo de frutas de piru.	Guanajuato
Sendecho	Especie de cerveza elaborada a base de maíz germinado.	Estado de Mexico
Tepache	Bebida embriagante elaborada con granos de maíz y piloncillo o panela.	Veracruz, Puebla, Guerrero Oaxaca y Chiapas.
Tesguino	Bebida embriagante elaborada con el zumo del tallo de maíz o con granos germinados.	Sonora, Chihuahua, Nayarit Zacatecas y Jalisco.
Vino de caña	Bebida embriagante preparada con infusión de caña de maíz molido	Estado de México y Morelos

(Cruz Ulloa, Ulloa, 1973)

En el caso del *Ogi* nigeriano se ha observado que durante el proceso de elaboración disminuye su valor nutritivo, durante la fermentación del grano molido se presenta un enriquecimiento de tiamina y niacina, pero no alcanza el nivel original del grano.

Particularmente se ha observado que las comunidades que consumen *Kenkey* tienen un mejor nivel nutricional que las que consumen los otros alimentos fermentados, se sabe que en esta fermentación se presenta un incremento de tiamina, riboflavina y proteína por actividad microbiana, llegando a tener de 7 a 12 g de proteína/100 g (base seca) (Campbell, 1987). En el caso del *Ogi*, algunas poblaciones de Nigeria consideran que estimula la producción de leche en las madres que amamantan a sus niños, se emplea en personas convalecientes debido a que es un alimento de fácil digestión. En cuanto al *Mahewu (Hagow)* se reporta que tiene una calidad proteínica pobre, el contenido de tiamina disminuye, la riboflavina permanece constante, únicamente el contenido de niacina disponible se duplica. En lo referente a *Koko* no se reporta incremento nutritivo. En ninguno de estos alimentos fermentados se ha reportado fijación de nitrógeno por actividad microbiana. Se observó que de estos alimentos el más similar al pozol es el *Kenkey*, pero en este no se ha reportado fijación de nitrógeno.

Se sabe que la proteína aumenta durante la fermentación del pozol. se ha sugerido que la fijación de nitrógeno juega un papel importante y que la nixtamalización la favorece. Considerando que durante la nixtamalización se suscitan en el maíz cambios importantes se esperaría que, la fermentación de maíz cocido sin cal presentará diferencias con respecto a la fermentación de maíz nixtamalizado. Para probar esta hipótesis, en este trabajo se determinaron los cambios químicos y microbiológicos en fermentaciones sólidas de ambos sustratos.

OBJETIVOS

Determinar si existen diferencias entre las fermentaciones de nixtamal y de maíz cocido sin cal en:

-El crecimiento de algunos grupos microbianos (bacterias lácticas, bacterias proteolíticas, microorganismos mesófilos aerobios, microorganismos fijadores de nitrógeno, mohos y levaduras)

-Proteína cruda, proteína soluble y la relación proteína/cenizas.

-Carbohidratos totales y reductores.

-Productos de fermentación: ácidos orgánicos (láctico, butírico, propiónico y acético)

-pH, acidez, y humedad.

MATERIALES Y METODOS.

2.1. Materia prima.

Se empleó maíz de la zona de Jalisco, amablemente proporcionado por Productos de Maíz, S.A.

2.2. Tratamiento del sustrato.

El sustrato fue sometido a dos tratamientos, nixtamalización y cocción.

En el caso de la nixtamalización, a un kilogramo de maíz se añadieron 3 litros de suspensión acuosa de Ca(OH)_2 (marca Baker 1372) al 1%. Se hirvió esta mezcla durante 30 minutos, después de los cuales se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 horas, después de las cuales se procedió a friccionar manualmente los granos para favorecer el desprendimiento de la cáscara o pericarpio. Posteriormente se enjuagó con agua de la llave durante 6 ocasiones.

Para preparar el sustrato de maíz cocido se siguió el mismo procedimiento pero sin añadir el Ca(OH)_2 .

Una vez lavado y escurrido el maíz se molió en molino eléctrico de tornillos Super Line S tipo SC-ES, 200 W 4P, para obtener la masa, a la cual se le ajustó la humedad a un valor de 60%.

2.3. Fermentación.

Se formaron bolas de 150 gramos con esta masa, se cubrieron con envoltura autoadherente "kleen-pack" (Kimberly-Clark) y con un asa microbiológica estéril se les hicieron 30 perforaciones distribuidas sobre la superficie de las bolas.

Para cada fermentación se formaron 28 bolas de masa y se colocaron en una incubadora Riessa modelo EC con control de temperatura a 28°C. Cada fermentación se llevó a cabo por duplicado.

2.4. Toma de muestras.

Se sacrificaron 2 bolas escogidas al azar a las 0, 4, 8, 20, 30, 50, 60, 80, 120, 160, 230, 300 y 350 horas.

Se pesaron las bolas a analizar y se procedió a homogenizarlas de manera aséptica en un vaso de precipitados estéril con ayuda de una espátula también estéril. De este homogenizado se tomaron 25 gramos en condiciones asépticas para realizar los análisis microbiológicos. Con el resto de la masa se realizaron los análisis químicos.

2.5. Métodos analíticos.

2.5.1. Análisis microbiológicos.

La muestra (25 g) se homogenizó en licuadora con 225 ml de una solución de peptona de soya al 0.1% . Posteriormente se hicieron diluciones decimales empleando agua peptonada al 0.1% como diluyente. Se procedió a inocular con las diluciones adecuadas para realizar la cuenta en placa de los siguientes microorganismos:

2.5.1.1. Bacterias mesófilas aerobias.

Se empleó el medio de agar cuenta en placa (Merck No 5463). Se inocularon 0.1 ml de las diluciones correspondientes por extensión con ayuda de una varilla de vidrio flameada, en cajas Petri. Se incubó durante 48 horas a 28°C.

2.5.1.2. Bacterias lácticas.

Para la cuenta de bacterias lácticas se empleó el medio MRS (Oxoid, CM 361). Se inoculó por el método de extensión, empleando 0.1 ml de la dilución correspondiente y colocándole, una vez que se hubiera absorbido la muestra, una sobrecapa del mismo medio, ya que estos microorganismos son microaerófilos. Se incubó durante 24 horas a 28°C.

2.5.1.3. Bacterias proteolíticas.

Para la cuantificación de este grupo microbiano se empleó como base el agar cuenta en placa (Merck No. 5463) con leche descremada al 10% (marca Sveltes, Nestlé S.A. de C.V.). Se inocularon 0.1 ml de las diluciones correspondientes por extensión, se incubaron las cajas Petri a 28°C durante 24 horas.

Se consideraron como colonias positivas aquellas que presentaron un halo transparente, muestra de la proteólisis de la caseína de la leche.

2.5.1.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno.

Para efectuar el conteo de estos microorganismos se emplearon las colonias presentes en el agar de cuenta en placa de las bacterias mesófilas aerobias, las cuales se sembraron en el medio Lipman carente de fuente de nitrógeno, cuya composición es la siguiente:

Formula del medio Lipman (Rubonchick, 1963)

Fosfato dipotásico	0.100 g
Fosfato monopotásico	0.400 g
Sulfato de magnesio	0.200 g
Cloruro de sodio	0.200 g
Cloruro de calcio	0.020 g
Cloruro férrico	0.010 g
Molibdato de sodio	0.002 g
Almidón	10.000 g
Agar	20.000 g
Agua destilada	1000.000 ml

Se efectuaron dos resiembras sucesivas para evitar resultados erróneos y se incubaron las cajas a 28°C durante 24 horas. Se consideraron bacterias fijadoras de nitrógeno a aquellas que mostraron crecimiento después de la segunda resiembra.

2.5.1.5. Mohos y levaduras.

Para la determinación de estos microorganismos se empleó el medio Agar de Dextrosa y Papa (Merck No 10130) acidificado con ácido tartárico al 10% hasta un pH de 3.5. Se inocularon 0.1 ml de la dilución apropiada por extensión y las cajas Petri se incubaron durante un lapso de 5 días a 24°C.

2.5.2. Análisis Químicos.

2.5.2.1. Humedad.

Se determinó empleando la Termobalanza CHAUS modelo 6010.

2.5.2.2. Determinación de pH.

Se tomaron 10 g de la muestra homogenizada y se dispersaron en 50 ml de agua destilada, recientemente hervida, fría y neutralizada. Se determinó el pH en un potenciómetro Beckman modelo PHI-41, calibrado con anterioridad con soluciones reguladoras de pH 4 y 7.

2.5.2.3. Acidez titulable.

Se tomó una alícuota de 10 ml, de la suspensión obtenida en la determinación de pH, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se adicionaron 0.1 ml de fenolftaleína (solución al 0.1% en etanol) como indicador. Se tituló con una solución valorada de NaOH 0.01N, hasta la persistencia de un color rosado durante 30 segundos. Se calculó el contenido de acidez y se expresó como ácido láctico por 100 g de muestra seca, utilizando el valor 0.09 que representa los miliequivalentes de ácido láctico.

2.5.2.4. Determinación de cenizas.

Estas fueron determinadas por el método gravimétrico, empleando crisoles de porcelana previamente puestos a peso constante. Se carbonizó en estos crisoles 1 g de muestra con ayuda de una parrilla eléctrica hasta nulo desprendimiento de humos, se calcinó en una mufla Sybron Thermolyne 1500 a 500°C hasta peso constante. Se calculó la cantidad de cenizas en 100g de muestra, en base seca.

2.5.2.5. Determinación de proteína cruda.

Se determinó nitrógeno por el método A. O. A. C. 2.057 (1984) como se describe a continuación:

I Digestión. Se colocó 1g de muestra en un matraz Kjeldahl. se añadieron 6g de Mezcla Reactiva de Selenio (Merck No. 8030), 25 ml de H_2SO_4 concentrado y piedras de ebullición. Se procedió a la digestión en una parrilla eléctrica con extracción de gases hasta que el líquido en el matraz fuera transparente y se dejó 30 minutos más.

II Destilación. El tubo terminal del refrigerante del destilador se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de ácido bórico al 2% conteniendo 0.1 ml del indicador rojo de metilo-azul de metileno. A la muestra digerida colocada en un baño de hielo se le añadieron 300 ml de agua destilada y fría, se homogenizó para añadirle posteriormente con sumo cuidado 60 ml de una solución de NaOH al 50%, para la formación de dos estratos. Se conectó el matraz a la trampa del destilador y se agitó, para iniciar la destilación. Se destilaron 150 ml y se procedió a la titulación.

II Titulación. Se tituló con solución valorada de HCl 0.1N hasta el virre del indicador. Se calculó el porcentaje de nitrógeno, el cual se multiplicó por el factor 6.25 para obtener los gramos de proteína cruda, por 100 gramos de materia seca.

2.5.2.6. Determinación de Proteína Soluble.

Se empleó el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se maceraron en mortero 4g de muestra y se aforaron a 50 ml con agua destilada, se agitó esta suspensión mecánicamente durante 30 minutos, se dejó decantar durante 30 minutos y se filtró el sobrenadante en papel Whatman No. 2.

A 1 ml de una dilución adecuada del sobrenadante anterior se le adicionaron 3 ml del reactivo C (50 ml de solución de Na_2CO_3 al 2% y tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1M, más 1 ml de la solución de CuSO_4 al 0.5% con una gota de H_2SO_4). Después de 10 minutos se adicionaron 0.3 ml de reactivo D (mezcla de reactivo Fenol Folin-Ciocalteu 231287) con agua destilada en una relación 1:1, agitando inmediatamente. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia del color azul producido a 750 nm contra un blanco preparado de igual forma con 1 ml de agua en vez de la solución a analizar.

Se calculó la concentración de proteínas por interpolación en una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica (Sigma No. A-4378) en concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tratadas de igual manera que las muestras. Se reportó la concentración de proteína soluble por 100 g de muestra en base seca.

2.5.2.7. Determinación de carbohidratos totales

En este análisis se empleó el método de fenol-sulfúrico (Sumner, 1935). Se empleó el mismo sobrenadante de la sección anterior para este análisis. A 1 ml de una dilución adecuada del mismo se le adicionaron 0.6 ml de solución acuosa de fenol al 5%, se agitó y posteriormente se añadieron 3.6 ml de H_2SO_4 concentrado homogenizando en Vortex (Super-Mixer 1290). Se dejó enfriar la

mezcla a temperatura ambiente 30 minutos y se determinó la absorbancia a 480 nm, frente a un blanco empleando agua como muestra. Se calculó la cantidad de carbohidratos presentes en base a una curva patrón de glucosa con concentraciones de 10 a 100 ug/ml. Se reportó la concentración de carbohidratos solubles totales por 100 g de muestra seca.

2.5.2.8. Determinación de azúcares reductores.

Se empleó el método de Bernfeld con DNS (Sumner, 1935). Se prepararon las muestras de la misma manera que en la determinación de carbohidratos totales.

A ml de una dilución apropiada del sobrenadante se añadió 1 ml de reactivo de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). Para desarrollar el color se colocaron los tubos en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, inmediatamente se enfriaron y se les añadieron 10 ml de agua destilada. Se determinó la absorbancia en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 3A leyéndose a una longitud de onda de 540 nm contra un blanco preparado con agua como referencia. La concentración azúcares reductores se calculó a partir de una curva patrón de glucosa con concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/ml. Se reportó la concentración de carbohidratos reductores solubles por 100 gramos de muestra seca.

2.5.2.9. Determinación de ácidos grasos.

Se determinaron por cromatografía en fase vapor.

Preparación de la muestra: Se pesaron 10 g de la muestra y se dispersaron en 25 ml de agua destilada, se agitó mecánicamente durante 30 minutos después de los cuales se centrifugó a 9000 RPM durante 20 minutos, empleando una centrifuga Damon/IEC Division International Equipment No.783, filtrando el sobrenadante obtenido

El filtrado se sometió a esterificación, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 1 ml de muestra se acidificó con 0.8 ml de H_2SO_4 (1:1 v/v), se añadieron 1.5 ml de metanol, se incubó esta solución a 55°C durante 1 hora enfriando inmediatamente.

Se inyectaron 2 μ l de la solución esterificada en cromatógrafo de gases Perkin Elmer Sigma 2B, bajo las siguientes condiciones de operación:

Columna Carbowax B 80/120, 3% SP-1500, acero inoxidable, 1/8 de pulgada por 3 metros.

Temperatura inicial 110°C durante 8 minutos.

Temperatura final 210°C, 15 min.

Velocidad de incremento 20°C/min.

Temperatura del inyector 200°C.

Temperatura del detector 200°C.

Detector FID800 (ionización de flama).

Gas acarreador nitrógeno.

Velocidad del gas acarreador 30 ml/min.

Se corrieron en las mismas condiciones las soluciones patrones empleando para esto ésteres de los ácidos analizados.

Se reportó el tipo de ácidos grasos volátiles y la cantidad de cada uno de ellos por comparación de los tiempos de retención y las áreas de los picos con una solución patrón.

2.6. Análisis estadístico.

Se empleó un diseño factorial split-plot para analizar las diferencias de proteína cruda entre los dos tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que el tratamiento alcalino (nixtamalización) modifica las propiedades del maíz y a que se han reportado diferencias entre los dos tipos de masas fermentadas, (Leal et al., 1987) se estudiaron con detalle los cambios microbiológicos y químicos durante la fermentación de ambas.

3.1. Análisis microbiológico.

La cuenta microbiana inicial en el nixtamal fue de 77 ufc/g de bacterias mesófilas aerobias, 5.3×10^2 ufc/g de bacterias lácticas y no se detectaron mohos, levaduras, bacterias proteolíticas ni bacterias fijadoras de nitrógeno. El maíz cocido en agua sin cal presentó una flora microbiana inicial compuesta de 1.6×10^3 ufc/g de bacterias mesófilas aerobias; 3.2×10^2 ufc/g de bacterias lácticas; 12 ufc/g de bacterias proteolíticas y no se detectaron mohos, levaduras, ni bacterias fijadoras de nitrógeno.

Salinas (citado por Ulloa, 1973) considera al tratamiento térmico alcalino como una especie de esterilización en el que se elimina la flora microbiana y se ha reportado (Ulloa, 1974) que es durante la manipulación de la masa de nixtamal donde se introducen los microorganismos que llevan a cabo la fermentación.

El sustrato sometido a tratamiento alcalino (nixtamalización) presentó una cuenta de mesófilos aerobios menor que el sustrato en el cual se suprimió este tratamiento, mientras que el número de bacterias lácticas fue similar en ambos. Si ambas masas fueron

manipuladas de la misma manera es probable que hayan sobrevivido menos microorganismos al tratamiento alcalino que a la cocción sin cal. Se esperaría que los sobrevivientes fueran microorganismos esporulados, que estarían incluidos en la cuenta de mesófilos aerobios. Por otra parte, no se esperaría que las bacterias lácticas sobrevivieran al tratamiento térmico. De esta forma las bacterias lácticas presentes en el sustrato inicial deben haber sido introducidas durante la manipulación. El hecho de que su cuenta inicial fue similar en ambos casos sugiere que esta es la razón.

3.1.1. Bacterias mesófilas aerobias.

El patrón de crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios fue similar en los dos tipos de sustratos utilizados (Figura 3.1).

En la fermentación del sustrato nixtamalizado se observaron velocidades específicas de crecimiento de 0.22 y 0.18 hr^{-1} respectivamente para cada repetición. Después de las 80 horas no se observó incremento en la cuenta. Por otra parte la fermentación del sustrato sin tratamiento alcalino mostró una velocidad específica de crecimiento mayor (0.56 y 0.46 hr^{-1}) y después de las 50 horas, al igual que con el sustrato nixtamalizado, no se observaron variaciones significativas en la cuenta microbiana. En la fermentación con nixtamalización se alcanzó el máximo crecimiento a las 80 horas ($6.2 \times 10^8 \text{ ufc/g}$), en tanto que en la fermentación de maíz cocido la cuenta máxima fue de $7.9 \times 10^7 \text{ ufc/g}$ y se presentó durante el transcurso de 30-50 horas.

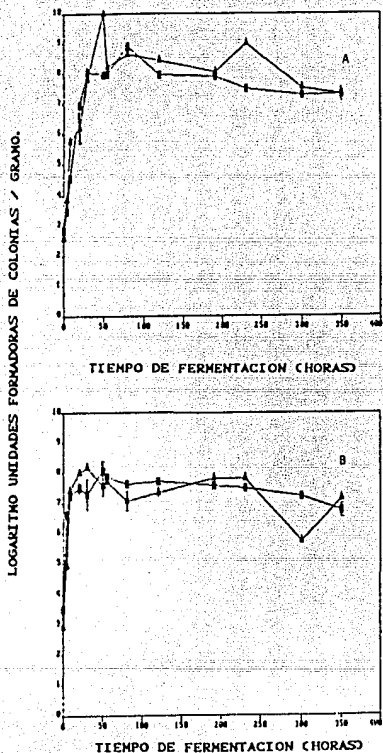


Figura 3.1: Cuenta viable de microorganismos mesófilos aerobios durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

Las diferencias de velocidad de crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias pueden deberse a las diferencias del pH inicial de ambos sustratos. El pH inicial del maíz cocido fue 5.9, 5.6 que está cercano al pH óptimo de la mayoría de las bacterias, en cambio, en el pH del nixtamal (8.3,9.2) su crecimiento es más lento.

3.1.2. Bacterias Lácticas.

La cinética de crecimiento de las bacterias lácticas se muestra en la Figura 3.2. En el sustrato con nixtamalización se alcanzó el máximo desarrollo a las 80 horas (7.9×10^7 ufc/g) y en la fermentación de maíz cocido a las 30 horas (7.2×10^7 ufc/g). Además en la fermentación de maíz cocido, después de alcanzarse el máximo desarrollo, éste decayó y no se recuperó. En cambio en el sustrato con nixtamalización la cuenta microbiana no disminuyó después de alcanzar el máximo valor.

Durante el tratamiento alcalino se presenta una pérdida de nutrimentos del maíz. Disminuyen la arginina y la cisteína (Sanderson et al. 1978), por la pérdida de constituyentes durante el procesamiento. También se pierden proteínas constituidas por albúminas y globulinas de bajo peso molecular, (Paredes-López y Saharópulos, 1981); sin embargo es más importante el incremento en aminoácidos disponibles (Craylot et al., 1945 y Breosan Paz, 1958). Este puede ser atribuido al desdoblamiento de proteínas por efecto del tratamiento alcalino, que rompe su estructura terciaria (Paredes-López y Saharópulos 1982).

Las bacterias lácticas presentan exigencias nutricionales complejas, ya que requieren aminoácidos, bases nitrogenadas y

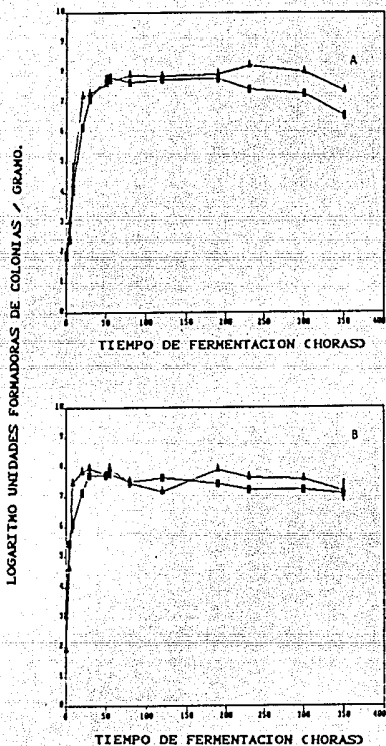


Figura 3.2:

Cuenta viable de bacterias lácticas durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).

Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

vitaminas (Schlegel, 1988). Considerando los cambios favorables que se suscitan durante la nixtamalización, se esperaría un mejor desarrollo de bacterias en el sustrato nixtamalizado. Sin embargo, se observó una velocidad de crecimiento inicial (0.83 hr^{-1}) mayor en el sustrato sin nixtamalizar debido probablemente a que el pH fue más favorable para su desarrollo (6.58) que el pH alcalino (8.39.2) del sustrato nixtamalizado, en el que se presentó una velocidad de crecimiento de 0.24 hr^{-1} .

En ambos sustratos se alcanzaron, aunque a diferentes tiempos, cuentas similares. El hecho de que en la masa de nixtamal la cuenta no haya decaído como en la de maíz cocido puede deberse a que en el nixtamal la cal neutraliza los ácidos que inhiben a las bacterias lácticas.

3.1.3. Mohos y levaduras.

La presencia de levaduras se detectó, como se muestra en la Figura 3.3, a partir de las 8 horas de iniciada la fermentación en el caso del sustrato con nixtamalización, en el que alcanzó el máximo desarrollo a las 55 horas ($7.6 \times 10^4 \text{ ufc/g}$). En el sustrato sin nixtamalización empezaron a desarrollarse a partir de las 20 horas hasta alcanzar un valor máximo a las 55 horas ($2.3 \times 10^5 \text{ ufc/g}$). En ambas fermentaciones el crecimiento tendió a decaer al final de la fermentación.

En cuanto al desarrollo de mohos, (Figura 3.4) empezó a las 20 horas, alcanzando un valor máximo a las 55 horas ($1.4 \times 10^7 \text{ ufc/g}$) en el sustrato sin nixtamalizar, para disminuir posteriormente a lo largo de la fermentación. En el sustrato con nixtamalización el máximo desarrollo fue de $1.6 \times 10^7 \text{ ufc/g}$ a las 50

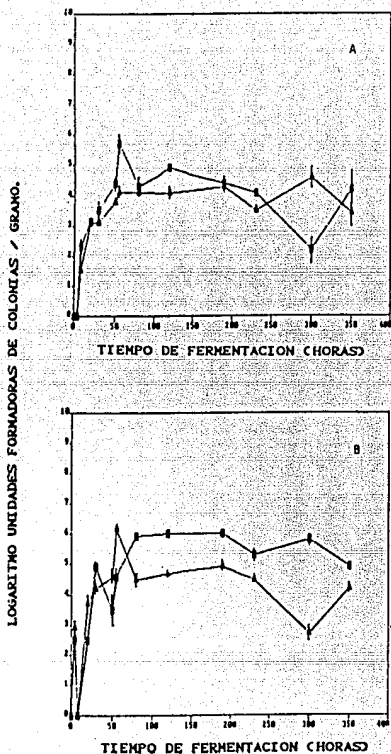


Figura 3.3:

Cuenta viable de levaduras durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).

Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

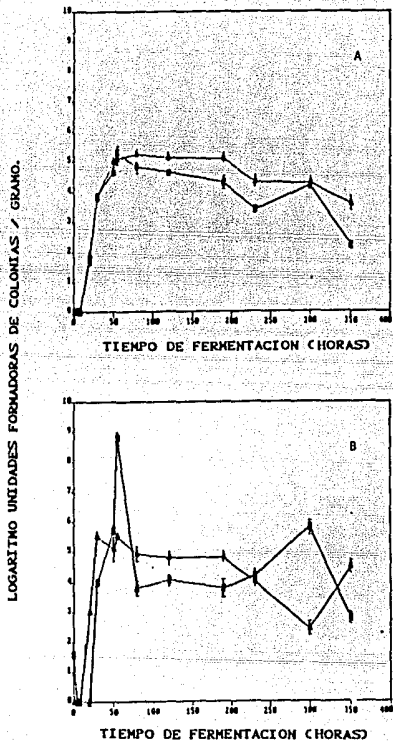


Figura 3.4: Cuenta viable de mohos durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

horas y después de este tiempo disminuyó la cuenta paulatinamente, de manera que al final de la fermentación se redujo en un ciclo logarítmico con respecto al valor máximo.

Al igual que el resto de los grupos microbianos, los mohos y levaduras crecieron más rápido en el sustrato de maíz cocido. La velocidad específica de crecimiento de las levaduras en maíz sin nixtamalizar fue de 0.19 y 0.22 hr^{-1} respectivamente para cada repetición y la de mohos 0.25 hr^{-1} , en tanto que para el sustrato de maíz nixtamalizado fue de 0.18 hr^{-1} en el caso de las levaduras, y de 0.13 hr^{-1} en el de los mohos. En ambos sustratos las cuentas microbianas de los mohos fueron similares; sin embargo el crecimiento de las levaduras fue mayor en la masa de maíz cocido. Se presentó una tendencia de disminución en la cuenta fungal después del crecimiento máximo de fijadores de nitrógeno, tal como lo reportó Aguilera (1989), pero éste no fue consistente, ya que se presentaron variaciones. Se ha reportado un efecto antagónico de *A. azotophilum* bacteria fijadora de nitrógeno aislada del pozol, sobre una gran variedad de microorganismos (Ulloa et al., 1983).

3.1.4. Microorganismos fijadores de nitrógeno.

En la Figura 3.5 se puede observar que los microorganismos fijadores de nitrógeno se empezaron a detectar a las 20 horas de iniciada la fermentación en el sustrato con nixtamalización y a las 30 horas en el sustrato sin nixtamalización, siendo las cuentas mayores en el primer caso. Los valores de máximo desarrollo microbiano fueron: En el sustrato de maíz nixtamalizado 7.5×10^7 y 1.1×10^8 ufc/g para cada repetición a las 80 horas y en

LOGARITMO UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS / GRAMO.

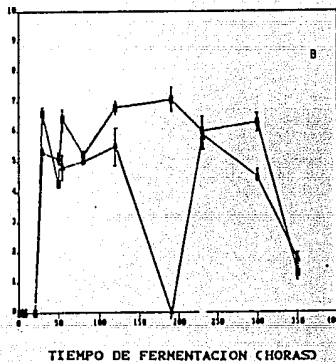
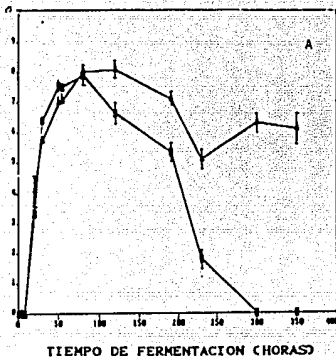


Figura 3.5:

Cuenta viable de microorganismos fijadores de nitrógeno durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

el sustrato de maíz cocido 1.2×10^7 ufc/g y 2.13×10^8 a las 100 horas. De esta manera, la cuenta máxima de microorganismos fijadores de nitrógeno fue aproximadamente un ciclo logarítmico mayor en nixtamal que en maíz cocido, lo cual sugiere que el nixtamal es un sustrato que favorece su desarrollo.

En ambos sustratos se observó que el crecimiento después de alcanzado el máximo desarrollo decayó. Esta caída fue más brusca y ocurrió antes en nixtamal que en maíz cocido. Este mismo patrón de crecimiento fue observado por Aguilera (1989), quien en fermentaciones de nixtamal encontró una cuenta máxima de crecimiento microbiano de 6×10^8 ufc/g a las 288 horas. Ella encontró que un número grande de bacterias fijadoras de nitrógeno no necesariamente repercutía en una mayor fijación de nitrógeno e infirió que este fenómeno está determinado por las asociaciones entre los microorganismos que participan en la fermentación del pozol.

3.1.5. Microorganismos proteolíticos.

La cuenta inicial de microorganismos proteolíticos en las diferentes masas no fue consistente, como se puede apreciar en la Figura 3.6. En el caso del maíz nixtamalizado se detectaron microorganismos proteolíticos (6.3×10^5 y 1×10^6 ufc/g) a las 20 horas mientras que en la otra se empezaron a detectar desde el inicio en una repetición (2.5×10^2 ufc/g), y a partir de las 30 horas en la otra, con una cuenta de 3.1×10^7 ufc/g. En ambos sustratos se obtuvo el máximo crecimiento microbiano a las 30 horas de fermentación, siendo de 2.2×10^8 ufc/g en el sustrato nixtamalizado y de 3.2×10^7 ufc/g en el sustrato sin nixtamalizar. Después de esto el crecimiento disminuyó paulatinamente.

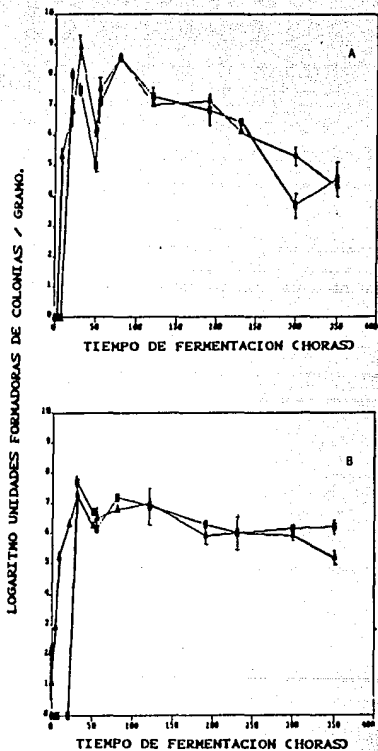


Figura 3.6: Cuenta viable de microorganismos proteolíticos durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

Las cuentas de este grupo microbiano fueron mayores en nixtamal que en maiz cocido. Esto se vio reflejado en una mayor concentración de proteina soluble en nixtamal que en maiz cocido (ver sección 3.2.8.). Cabe mencionar que el desarrollo de bacterias lácticas no se vio favorecido por esta mayor concentración de proteina soluble (ver Figura 3.2).

Tongnual y Fields (1981) reportaron la importancia de los microorganismos proteolíticos en la fermentación de maiz. Dedujeron que el crecimiento y la actividad de microorganismos proteolíticos en atoles de este cereal incrementa la disponibilidad de aminoácidos, que son nutrimentos esenciales para bacterias lácticas y también podrían ser utilizados por el resto de la microflora. De la misma manera el aumento en la disponibilidad de aminoácidos producido por la fermentación eleva el valor nutricional del maiz para consumo humano.

3.2. Análisis químicos.

3.2.1. Humedad.

En todos los casos durante la fermentación de ambos sustratos la humedad disminuyó. Se iniciaron con un valor del 60%, alcanzando valores finales de 48.2% y 53.3% en el sustrato sin nixtamalizar y de 52.2% y 52% en el sustrato nixtamalizado, como se muestra en la Figura 3.7.

En la secuencia de la deshidratación se observó un ligero ascenso entre las horas 80-120, el cual coincidió con el momento en el cual los fijadores de nitrógeno empezaron a desarrollarse. Esto pudo haber sido causado por el crecimiento de *Agrobacterium azotophilum*, habitante común del pozol (Ulloa et al., 1983). Esta bacteria fijadora de nitrógeno es capsulada y el polímero que forma su cápsula podría ser el causante de la retención de humedad. Este mismo efecto fue observado por Aguilera (1989) en fermentación sólida de nixtamal con diferentes inóculos. Este incremento de humedad podría atribuirse igualmente a la fermentación aerobia, por medio de la cual se oxidan los carbohidratos a CO_2 y agua. De hecho, la hora 50 corresponde a un periodo de alta actividad microbiana. Posteriormente el contenido de agua siguió descendiendo, debido a la deshidratación de las bolas de pozol, ya que la humedad del ambiente donde se efectuó la fermentación no se controló.

La pérdida de humedad fue similar en todos los casos, excepto en el de una de las repeticiones de la fermentación de maíz cocido, en la que se obtuvieron valores significativamente menores. Esto pudo haber sido debido a cambios en la humedad ambiente cuando se realizó esa fermentación.

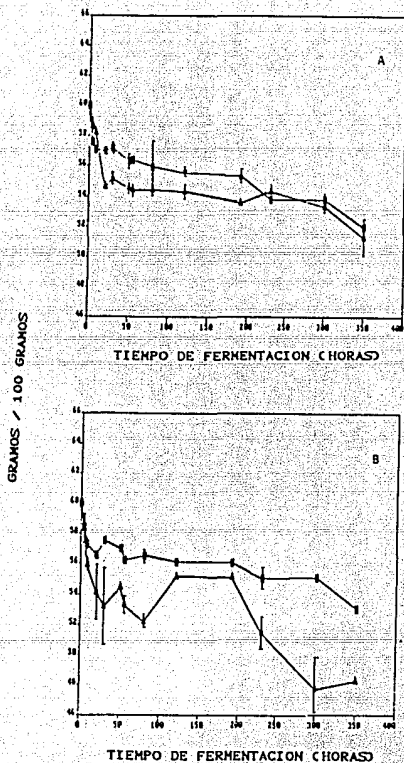


Figura 3.7:

Variación de humedad durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).
Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

El valor de pH es una de las principales diferencias entre los sustratos empleados, (Figura 3.8) siendo de 8.3-9.2 en el sustrato nixtamalizado y de 5.9-5.6 en el sustrato de maíz cocido. A esto se le atribuyeron diferencias en el desarrollo microbiano entre los dos tipos de masas.

El descenso de pH en la fermentación de maíz nixtamalizado fue muy drástico del inicio a las 50 horas (7.3-8.5 a 4.8-4.0). Por otra parte, en la fermentación del sustrato sin nixtamalizar el valor de pH disminuyó de 5.9-5.6 a 4.2-4.0 del inicio a las 80 horas de fermentación. Este cambio coincidió con la fase exponencial de crecimiento de las bacterias lácticas. A pesar de las diferencias iniciales, el valor de pH en ambos sustratos se igualó (3.9-4.2 en nixtamal y 3.8-3.8 en maíz cocido) a partir de la hora 50-55 siendo al final de la fermentación similares: 3.0-4.1 en el sustrato de maíz nixtamalizado y 3.8-3.8 en el sustrato de maíz cocido.

Se atribuye el descenso de pH al crecimiento de bacterias lácticas, las cuales producen los ácidos lácticos y acético, que de hecho fueron los que se encontraron en mayor concentración (ver sección 3.2.4.). El valor de pH continuó descendiendo aún después de que la cuenta de bacterias lácticas ya no se incrementó. Esto demuestra que las bacterias lácticas estaban metabólicamente activas. Probablemente la cuenta de estas bacterias se mantuvo constante porque las bacterias muertas eran reemplazadas por el mismo número de bacterias viables.

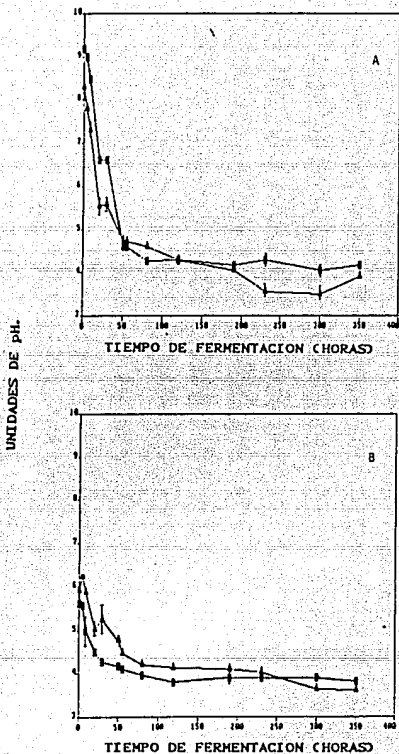


Figura 3.8: Variación de pH durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

3.2.3. Acidez titulable.

Como se puede observar en la Figura 3.9, el incremento en la acidez titulable fue más rápido en maíz cocido que en nixtamal al inicio de la fermentación. Esto se debe a que el hidróxido de calcio del nixtamal neutraliza los ácidos producidos.

En todos los casos se observó un incremento de acidez titulable durante la fermentación. Se obtuvieron valores similares en las dos fermentaciones de maíz cocido, pero en las de nixtamal se encontraron diferencias significativas entre las dos repeticiones a partir de la hora 100. En una de ellas la acidez fue menor que en las fermentaciones de maíz cocido y en la otra fue mucho mayor.

El incremento en acidez titulable se debe a la producción de ácidos, pero éstos pueden a su vez ser consumidos por otros microorganismos como fuente de carbono o transformados en otros compuestos, como ésteres. Debido a esto, las variaciones de acidez titulable dependen tanto del desarrollo de los microorganismos que los producen como de los que los transforman. En las fermentaciones realizadas no se controló la microflora, por lo que las diferencias de acidez titulable podrían atribuirse a diferencias en el desarrollo de los microorganismos que los transforman.

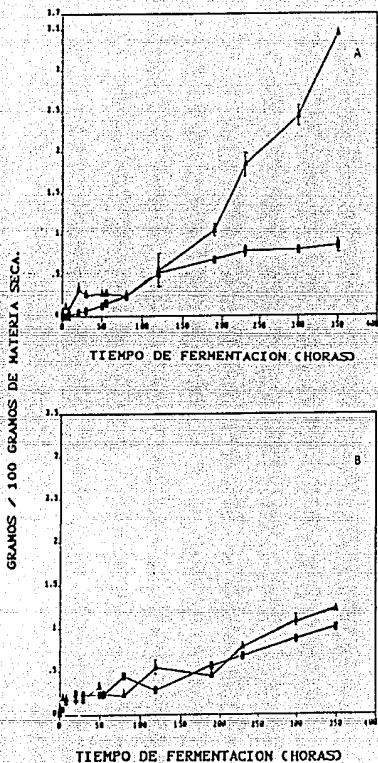


Figura 3.9:

Variación de acidez titulable (expresada como ácido láctico) durante la fermentación sólida de nixtamal (A) maíz cocido (B).

Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

3.2.4. Ácidos láctico y acético.

63

Ambos son producidos por bacterias lácticas, como lo señalan Akinrele (1970) y Fields (1981), quienes establecen que las bacterias lácticas son las principales responsables de la producción de estos ácidos. Las bacterias homofermentativas producen principalmente ácido láctico en tanto que las heterofermentativas producen los ácidos láctico y acético. En ambos casos se observó un patrón global típico de una fermentación heteroláctica, en donde se produjeron ambos ácidos. (ver Figura 3.10 para ácido láctico y Figura 3.11 para ácido acético).

El patrón de fermentación fue diferente en ambos casos. En la masa de nixtamal las concentraciones de los ácidos láctico y acético fueron mayores al inicio que al final de la fermentación (2.1% ácido de láctico, 1.2 % de ácido acético). Lo contrario ocurrió en las masas de maíz cocido, en donde la concentración de ambos ácidos fue menor al inicio que al final. Se observaron variaciones en los duplicados pero aún así fue posible observar la misma tendencia.

La presencia de estos ácidos seguramente se debe al desarrollo de las bacterias lácticas desde el inicio de la fermentación, pero en el sustrato de maíz cocido se desarrollaron probablemente microorganismos consumidores de ellos al principio y en el sustrato de maíz nixtamalizado al final de la fermentación. Dentro de los microorganismos capaces de utilizar estos ácidos se encuentran algunos que utilizan ácido láctico para producir una variedad de aldehidos y ésteres, (por ejemplo *Geotrichum sp.*) los cuales seguramente contribuyen al olor característico de este producto (Nuraida, 1988).

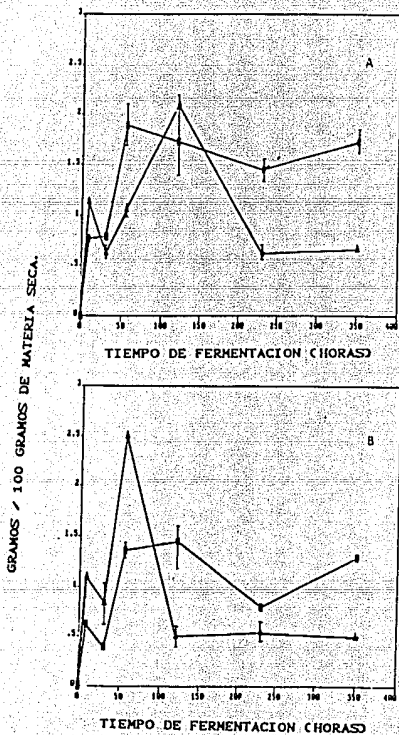


Figura 3.10:
 Concentración de ácido láctico durante la fermentación
 sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).
 Se presentan los valores obtenidos en dos
 fermentaciones de cada tipo.

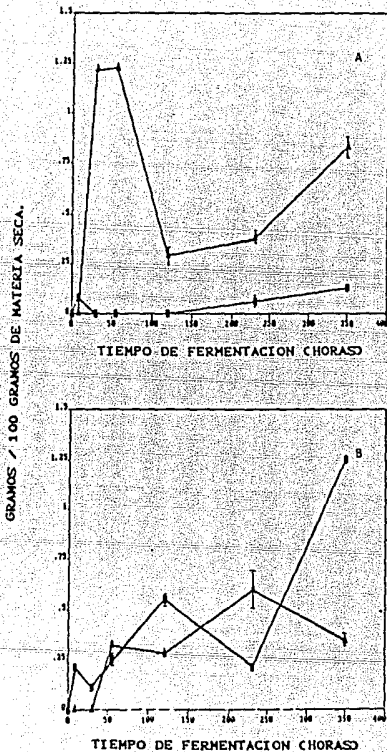


Figura 3.11:
 Concentración de ácido acético durante la fermentación
 sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).
 Se presentan los valores obtenidos en dos
 fermentaciones de cada tipo.

Por otra parte las diferencias pueden haber sido debidas a diferencias metabólicas de bacterias lácticas en los dos sustratos.

Se ha reportado que algunas levaduras, como *Bretanomyces* producen ácido acético y han sido reportadas en la fermentaciones de maíz (Lappe, 1988), por lo que es probable que parte del ácido acético producido provenga de levaduras del pozol.

Estos ácidos, además de contribuir al sabor característico provocan un efecto inhibitorio de microorganismos no deseables.

3.2.5. Acido butírico.

En los dos sustratos se observó que se produjo ácido butírico a partir de las 120 horas de fermentación (Figura 3.12), obteniéndose una mayor concentración en el sustrato de maíz nixtamalizado (0.2, 0.8%) a las 230 horas, en comparación con el sustrato de maíz cocido (0.6, 0.3%) a las 350 horas.

El ácido butírico es el producto final del metabolismo de muchos microorganismos anaerobios, como los del género *Clostridium*. Algunas de sus especies, como *C. butyricum*, además de producir ácido butírico producen ácido acético, láctico, CO_2 e H_2 y fijan nitrógeno (Rosenblumand y Wilson, 1949). También *C. pasteurianum* fija nitrógeno, sintetiza leucina (Wiegel, 1977) y requiere molibdeno para la síntesis y actividad de la nitrogenasa (Cárdenas y Mortenson, 1975).

Así la presencia de ácido butírico indica actividad anaeróbica. Durante el amasado se incorpora oxígeno al sustrato, el cual debe ser utilizado en el periodo de máxima actividad microbiana. Una vez consumido el oxígeno que había quedado

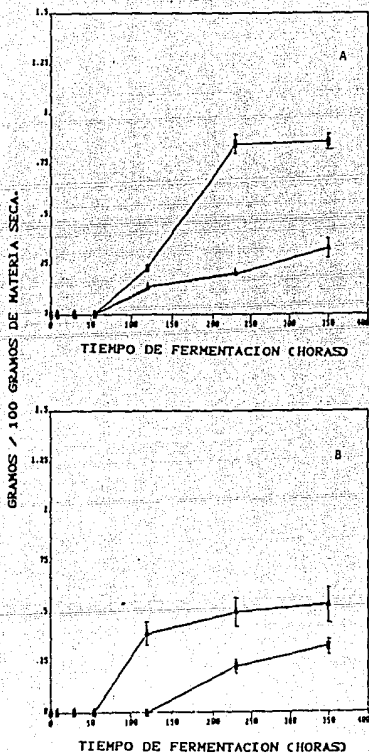


Figura 3.12:

Concentración de ácido butírico durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B).

Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

atrapado en la masa, se crean condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos anaerobios y esta podria ser la razón de la aparición de ácido butírico en etapas tardías de la fermentación.

Características importantes del género *Clostridium* son su crecimiento bajo condiciones anaerobias (*C. pasteurianum* y *C. Kleyveri* son anaerobios estrictos, mientras que *C. histolyticum* y *C. acetobutylicum* son aerotolerantes), la resistencia de sus esporas al calor y su capacidad de metabolizar polisacáridos como almidón, celulosa y hemicelulosa. Resulta razonable suponer que estos microorganismos se desarrollan en el momento en que seguramente la mayoría de los carbohidratos disponibles de la masa han sido consumidos por la microflora inicial de la fermentación. La aparición de ácido butírico coincidió con el aumento en la concentración de reductores por lo que microorganismos anaerobios de este tipo pudieron haber contribuido en la hidrólisis del almidón de la masa.

3.2.6. Acido propiónico.

En la mayoría de las muestras no se detectó presencia de ácido propiónico. (Figura 3.13) A pesar de que el sustrato contiene las condiciones para el desarrollo de bacterias del grupo *Propionibacterium*: anaerobiosis, factores de crecimiento, y lactato (Nakayama, 1981). Sólo se detectó este ácido en uno de los experimentos. Probablemente esto se haya debido a una contaminación casual de *Propionibacterium*.

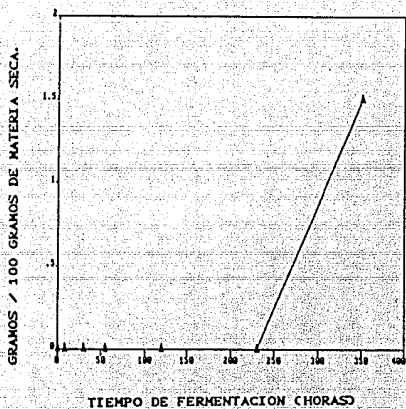


Figura 3.13:
Concentración de Ácido propiónico en una de las fermentaciones de maíz cocido.

3.2.7. Proteína cruda.

Durante el proceso de fermentación se produjo en todos los casos un incremento en la proteína cruda (Figuras 3.14); sin embargo se observaron diferencias entre ambos sustratos. En el sustrato de maíz nixtamalizado se observó que, partiendo de un valor inicial de 9.5%, la proteína cruda tendió a aumentar desde las primeras horas de fermentación. Esta continuó incrementándose hasta las 230-280 horas, cuando se alcanzaron valores máximos de 10.9%-11.3%, para cada una de las repeticiones.

El contenido de proteína cruda de la masa de maíz cocido (9.2-9.7%) fue similar al de maíz nixtamalizado, pero en esta fermentación, a diferencia de la de nixtamal, se presentó un decremento de proteína cruda en el intervalo de cero a 30 horas. A partir de esta hora el contenido de proteína aumentó, hasta alcanzar valores máximos de 10.4-10.5% alrededor de las 250 horas de fermentación.

Al realizar un análisis de varianza se encontró que no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las dos repeticiones de la fermentación de maíz cocido ($p < 0.05$); mientras que en las dos fermentaciones de nixtamal sí hubo diferencias después de la hora 50, ($p < 0.05$)

El contenido de proteína fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en nixtamal que en maíz cocido a la hora 230. De acuerdo con las diferencias presentadas, esto fue el resultado de la actividad observada en las primeras horas de fermentación, ya que en el caso del nixtamal se incrementó desde el inicio, pero el decremento en la concentración de la proteína cruda al inicio de la fermentación de maíz cocido fue razón por la cual en esta

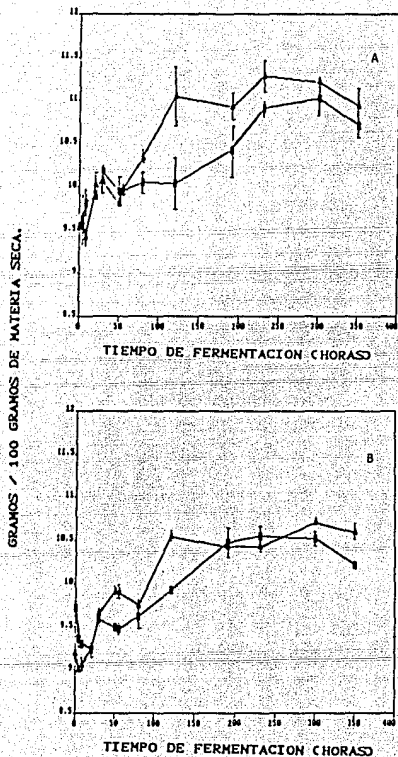


Figura 3.14:

Concentración de proteína cruda durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

fermentación se alcanzaron valores finales menores. La velocidad de incremento de proteína fue aproximadamente igual en ambas fermentaciones, pero el valor máximo en la masa de maíz cocido fue menor que en nixtamal.

El hecho de que las cuentas microbianas fueran similares en ambas masas al tiempo de máxima concentración de proteína sugiere que el incremento de proteína no se debe únicamente al aumento de biomasa microbiana. Por otra parte, es evidente que existen diferencias en el metabolismo nitrogenado entre ambos sustratos en las primeras horas de fermentación, los cuales deberán ser estudiadas con más detalle.

Al igual que en estudios anteriores (Aguilera 1989), la máxima concentración de proteína se logró a los 10 días de iniciada la fermentación y el periodo en el que aumentó la proteína coincidió con el periodo en que las bacterias fijadoras de nitrógeno se mantienen viables. La fase de decaimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno (después de las 250 horas) coincidió con la disminución en la concentración de proteínas en ambas fermentaciones.

3.2.8. Proteína soluble.

Con respecto a la variación de proteína soluble durante la fermentación, en la Figura 3.13 se observa claramente lo siguiente: inicialmente ambos sustratos presentaron concentraciones similares de proteína soluble (0.54% y 0.55% para nixtamal y maíz cocido respectivamente). Después de la hora 80 en el maíz nixtamalizado el incremento fue muy brusco hasta alcanzar valores máximos de 3.8% y 3.1% respectivamente para cada

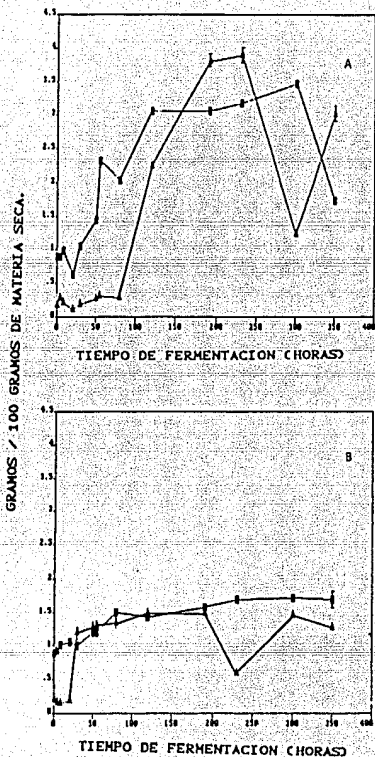


Figura 3.15: Concentración de proteína soluble durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

repetición a las 190 horas, en tanto que en el sustrato de maíz cocido, la concentración de proteína soluble permaneció constante (1.4%) aumentando tan sólo ligeramente en una repetición caso a 1.7% a las 300 horas.

No se presentó una relación directa entre los microorganismos proteolíticos y la concentración de proteína soluble. Las diferencias observadas pueden haberse debido a que la actividad proteolítica haya sido mayor en nixtamal que en maíz cocido. De hecho se ha reportado que el calcio ejerce un efecto estabilizador sobre las proteasas de bacterias lácticas en leche (Marshall, 1984). Debe hacerse notar que la detección de estos microorganismos se basó en hidrólisis de caseína y la acción de las proteasas de los microorganismos sobre las proteínas del maíz podría diferir.

Esta diferencia en el contenido de proteína soluble fue la más marcada entre ambas fermentaciones. Un mayor contenido de proteína soluble implica un mayor contenido de proteína disponible para crecimiento microbiano y, por supuesto, también para consumo humano. Las diferencias observadas entre ambas fermentaciones implican diferencias en producción y/o consumo de proteína soluble. La proteína soluble no aumentó en las primeras horas de fermentación, debido probablemente a que fue el periodo de máxima actividad microbiana y en el que los microorganismos hubieran utilizado los productos de la proteólisis. Será necesario investigar si los cambios posteriores son debidos a la fijación de nitrógeno o a diferencias en la actividad proteolítica entre ambas fermentaciones.

3.2.9. Proteína/cenizas.

El incremento en la concentración de proteína cruda pudo haberse debido al incremento en la concentración de biomasa o a la fijación de nitrógeno. La concentración de proteína cruda se reportó en base seca, o sea como el porcentaje de proteína del material seco de la muestra. De esta manera el incremento en proteína cruda observada pudo haberse debido a un aumento relativo de proteína debido a una disminución en la concentración de materia orgánica (Esta puede perderse como CO_2 por metabolismo aerobio).

Con el fin de determinar si durante la fermentación ocurrió un aumento efectivo en la concentración de proteína (o nitrógeno); o sea, si se llevó a cabo el fenómeno de la fijación de nitrógeno, se midió la relación proteínas/cenizas. El principio de esta determinación se explica a continuación.

Considerando que las cenizas son el residuo inorgánico obtenido por incineración, éstas contienen todos los minerales de la muestra. Tomando en cuenta que durante la fermentación no se modifica la cantidad de cenizas, ya que los microorganismos los emplean en mínima proporción y éstos permanecen dentro del sistema, se puede emplear el contenido de cenizas como base para realizar un balance de materia. De esta manera el incremento de la relación proteína/cenizas indica la entrada de nitrógeno al sistema, o sea la fijación de nitrógeno.

Se midió la relación proteínas/cenizas durante la fermentación y como puede observarse en la Figura 3.18 se aprecian dos periodos de incremento de esta relación en ambos sustratos. En

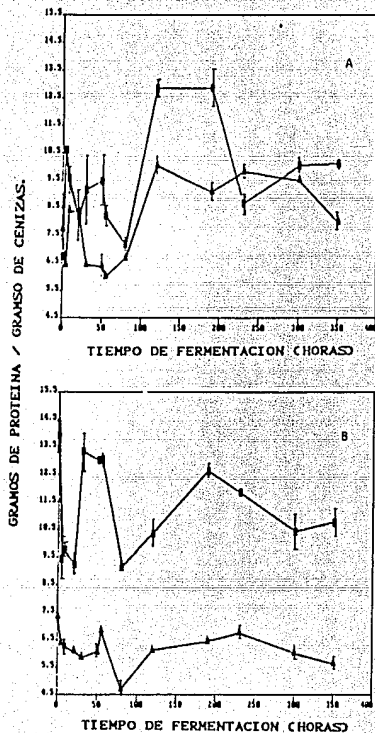


Figura 3.16:

Variación de la relación proteínas/cenizas durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

el maíz nixtamalizado el primero se presentó desde el inicio hasta las 20 horas y el segundo a partir de las 120 hasta las 190 horas. En el caso del sustrato de maíz cocido en el inicio de la fermentación esta relación disminuyó, presentándose el primer incremento a partir de las 50 horas y el segundo de las 120 a las 190 horas. Esta tendencia se debe probablemente a la relación que existe con el hecho de que en el sustrato de maíz cocido la concentración de proteína cruda disminuyó en el inicio, en comparación con el sustrato de maíz nixtamalizado en el que aumentó. A partir de lo anterior se infiere que en el sustrato de maíz nixtamalizado hay fijación de nitrógeno desde el inicio de la fermentación, mientras que en el sustrato de maíz cocido la fijación de nitrógeno empezó después.

Ambas fermentaciones mostraron un comportamiento similar al observado en el trabajo efectuado por Aguilera (1989). En este trabajo se presentaron dos incrementos en la relación proteína/cenizas que correspondieron a dos periodos de fijación de nitrógeno. El primero se atribuyó al crecimiento de los microorganismos fijadores de nitrógeno mesófilos aerobios. En el segundo periodo de fijación de nitrógeno los microorganismos fijadores de nitrógeno aerobios estaban en fase de decaimiento por lo que se supuso que esta pudo haber sido efectuada por otros microorganismos, probablemente anaerobios, como bacterias del género *Clostridium*, o por alguna interacción de los microorganismos de la microflora del pozol.

De esta manera se corrobora el efecto positivo de la nixtamalización en la fijación de nitrógeno, reportado por Leal et al. (1987). El hecho de que ésta se presente desde el inicio en

el nixtamal indica que éste es un sustrato que por alguna razón la favorece. Taboada y Herrera (1972) reportaron que ciertos aminoácidos, como la isoleucina y la metionina estimulan la fijación de nitrógeno en *A. Azotophilum*. Probablemente la proporción de aminoácidos en nixtamal favorece la fijación de nitrógeno.

La disminución inicial de la relación proteínas/cenizas en maíz cocido puede haberse debido a pérdidas de nitrógeno en forma de amoníaco. Así, en la primeras horas de fermentación deben crearse las condiciones favorables para que ocurra la fijación de nitrógeno, ya que la relación proteína/cenizas se incrementó a partir de la hora 50. Será necesario estudiar con más detalle los factores, tanto microbiológicos como bioquímicos que afectan la fijación de nitrógeno.

3.2.10. Carbohidratos solubles totales.

Ambos sustratos contienen desde el inicio de la fermentación carbohidratos solubles totales, en mayor cantidad en el sustrato de maíz nixtamalizado (1.4 y 1.8% que el sustrato de maíz cocido (0.80 y 0.82%), (Figura 3.17).

Los principales constituyentes del maíz son los carbohidratos, presentes como tejido de almacenamiento, principalmente en el endospermo, donde el almidón comprende el 88% en peso seco y los azúcares el 1%. En el maíz se encuentran carbohidratos simples como monosacáridos principalmente D-fructosa y D-glucosa; di y trisacáridos como sacarosa y maltosa; carbohidratos complejos estructurales, principalmente en la cáscara tales como hemicelulosa, celulosa, lignina y sustancias

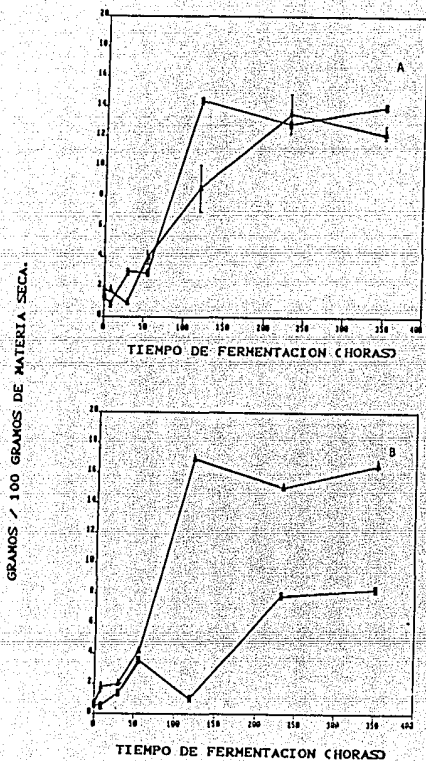


Figura 3.17: Concentración de carbohidratos solubles totales durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

pécticas; carbohidratos complejos de almacenamiento como el almidón el cual contiene lípidos y proteínas asociados. (Wilson, 1987)

Cuando el almidón sufre una cocción alcalina en presencia de CaO se solubiliza y disminuye su peso molecular aparente, esto es, se despolimeriza (Jackson et al., 1988). A esto se debe el mayor contenido de carbohidratos solubles en el nixtamal que en el maíz cocido.

Durante la fermentación aumentó la concentración de carbohidratos solubles totales, lo cual implica que se degradó el almidón. En ambos sustratos los carbohidratos solubles aumentaron ligeramente durante las primeras 55 horas de fermentación, después de las cuales el incremento fue más drástico, alcanzando en el sustrato de maíz nixtamalizado un valor máximo de 13.2% a las 230 horas y en el sustrato de maíz cocido 12.4% a las 350 horas, todo en base seca.

3.2.11. Carbohidratos solubles reductores.

Los carbohidratos solubles reductores se encuentran desde el inicio de la fermentación en concentraciones similares en ambos sustratos (Figura 3.18) siendo de 0.30% y 0.33% en el maíz nixtamalizado y de 0.26% y 0.32% en el sustrato de maíz cocido.

Los azúcares reductores forman el 9.4% del total de los carbohidratos del maíz en peso seco, cantidades que pueden disminuir con la edad del grano (Creach, 1965). Se ha reportado que el poder reductor se incrementa cuando se somete a condiciones alcalinas severas (Badui, 1984), pero en este caso este efecto no se observó. Estos aumentaron en forma paulatina hasta las 55

horas, después de las cuales el incremento fue mayor en el sustrato de maíz cocido, alcanzando un valor de 5.0%-9.4% a las 350 horas, en tanto que en el sustrato de maíz nixtamalizado fue de 0.7%-4.3% a las 230 horas. El hecho de que aumente la concentración de azúcares reductores implica que el almidón está siendo degradado hasta oligosacáridos de bajo peso molecular durante la fermentación.

Asmah (1988) encontró que los azúcares solubles en el maíz constituyen el 2.2% del total de azúcares, cantidad que podría ser suficiente para mantener la fermentación sin necesidad de romper el almidón probablemente durante las primeras horas de fermentación.

La mayoría de las levaduras aisladas del pozol presentan una ligera actividad hidrolítica del almidón (Nuradia, 1988), esto se refuerza con el hecho de que en ambas fermentaciones coincide el incremento en la concentración de carbohidratos totales y reductores con el de levaduras y mohos.

Existen bacterias lácticas capaces de hidrolizar el almidón, como algunos *Streptococcus*, *Lactobacillus amylophilus* y *L. amylovarans* (Sneath et al., 1986), así como algunas bacterias del género *Leuconostoc*, pero no se ha reportado cuáles de estos microorganismos son capaces de hidrolizar el almidón completamente. Aproximadamente el 50% de los carbohidratos solubles totales eran reductores, por lo que una buena proporción de almidón sí se hidrolizó hasta maltosa y glucosa.

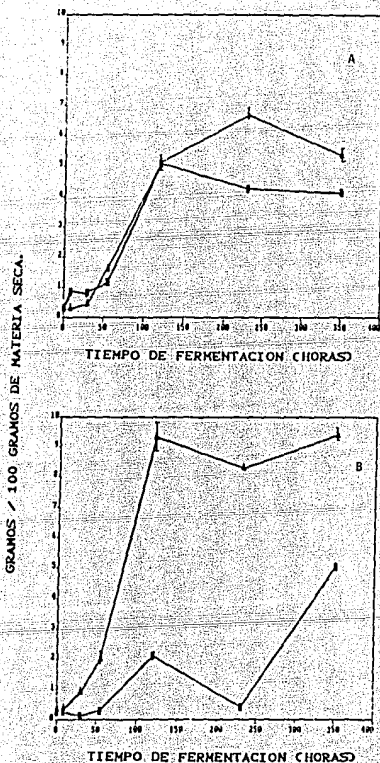


Figura 3.18: Concentración de carbohidratos solubles reductores durante la fermentación sólida de nixtamal (A) y maíz cocido (B). Se presentan los valores obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se estudió el efecto de la nixtamalización en la fermentación sólida de maíz, comparando los cambios bioquímicos y microbiológicos, que se producen en el sustrato de maíz cocido con los de maíz nixtamalizado (pozol).

En relación a la población microbiana se presentó una sucesión microbiana similar en ambos sustratos: primero se desarrollaron las bacterias mesófilas aerobias y las bacterias lácticas; posteriormente hongos, levaduras y bacterias proteolíticas, presentándose al final los microorganismos fijadores de nitrógeno.

La velocidad específica de crecimiento de los grupos microbianos en ambos sustratos fue diferente, siendo mayor en el sustrato de maíz cocido que en el de maíz nixtamalizado.

En cuanto a los cambios bioquímicos se observó que la diferencia inicial más importante fue el pH, que seguramente determinó diferencias en velocidad de crecimiento.

Las diferencias más notables fueron:

La concentración de proteína soluble fue mayor en el sustrato de maíz nixtamalizado que en el de maíz cocido.

En la fermentación del sustrato de maíz nixtamalizado se observó una concentración mayor de proteína cruda, en comparación con el sustrato de maíz cocido.

Estos cambios se atribuyeron a que, tanto la proteína cruda como la relación proteína/cenizas disminuyeron en las primeras horas de la fermentación en el sustrato de maíz cocido, mientras que en el sustrato de maíz nixtamalizado no se presentó disminución inicial. De esto se infirió que existen diferencias en el metabolismo nitrogenado al inicio de ambas fermentaciones, que resultaron en diferencias en concentración de proteína cruda al final de la fermentación.

En ambos sustratos ocurre una fermentación heteroláctica, pero el patrón de los ácidos fue diferente.

La concentración de carbohidratos solubles aumentó de forma similar en ambos sustratos siguiendo el mismo patrón, denotando que el almidón se degradó durante la fermentación.

A pesar de tratarse de una fermentación sólida, en la que se presentan problemas de homogenización del sustrato al muestrear y de ser una fermentación espontánea, los resultados obtenidos en dos fermentaciones de cada tipo de sustrato fueron similares.

Todo lo anterior sugiere que existen diferencias en el metabolismo de los microorganismos en ambos sustratos. Para comprenderlas será necesario realizar estudios con cepas puras inoculadas en material estéril.

Aguilera, D. (1989) Estudio microbiológico y bioquímico de la fermentación del pozol. Tesis de Maestría en Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Universidad Iberoamericana, México. 93 pp.

Akinrele I.A. (1970) Fermentation studies on maize during the preparation of traditional African starch-cake food. *Journal of Science Food Agriculture*. 21:619-625.

Alcaraz J.A. (1949). El maíz, su cultivo, origen, ritos, fiestas, leyendas y literatura. Ediciones Indivisa Manent-Sena. 102:68-71. (Citado por Cruz Ulloa 1973).

Alvarez, E. y López, A. (1987). Fermentación Láctica de materiales feculentos para la producción de Alimentos para monogastricos. Tesis profesional. Escuela de Química. Universidad La Salle, pp 134-137.

Asmah H. (1988) Microbe-microbe and microbe substrate interactions in fermenting maize dough. M Sc dissertation. (Citado por Nuraida 1988)

Aspinall, G.O., (1982). Chemistry of cell wall polysaccharides. *The Biochemistry of Plants*, Vol 3. J. Press, ed. Academic Press, New York pp. 473-500.

Baduí D.S. (1982) Química de los Alimentos. Alhambra Mexicana, S.A. Primera edición, p 430.

Bressani, R. Paz y Paz R. Scrimshaw S Nevin, (1958) Chemical Changes in Corn during Preparation of tortillas. *Agricultural and Food Chemistry* Vol 6, 10:770-778.

Boundy, J.A., Turner, J.E., Wall, J. S. y Dimler, R.J. (1967). Influence of commercial processing on composition and properties of corn zein. *Cereal Chem.* 44:281-287. (Citado por Watson, 1987).

Boyer, D. Ch., Shannon C.J. (1987) Carbohydrates of the kernel. en Watson, A.S., Ramstad, E.P. (eds) *Corn: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists Inc. Minnesota USA. p 253-271.

Brock, T., Smith, D.W., Madigan, M.T., (1984). *Biology of Microorganisms*. Prentice/Hall International Editions. Fourth edition. 847 pp.

Campbell-Platt, G. (1987). *Fermented Food of the World*. Butterworths Cambridge University Press. Cambridge, G. Britain. 291 pp.

Cardenas, J. y Mortenson, L.E. (1975) Role of molybdenum in dinitrogen fixation by *Clostridium pasteurianum*. J. Bacteriol. 123:978-984. (Citado en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2, 1983).

Cravioto R.O., Massieu H., Cravioto O.Y., Figueroa F de M., (1952) Journal Nutrition 48:453.

Cravioto R.O., Cravioto G., Massieu-H., Guzman J. (1955) El pozol, forma indigena de consumir el maiz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. Ciencia, México 15:27-30.

Creech, R.G. (1965) Genetic control of Carbohydrate synthesis in maize endosperm. Genetics 52:1175-1186. (Citado por Boyer, D.Ch.)

Cruz Ulloa S., Ulloa M (1973) Alimentos fermentados de maiz consumidos en México y otros países latinoamericanos. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 34:423-457.

Dubois M, Gilles, K.A. Hamilton, J.K. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related substances. Analytical Chemistry, Vol 26,(3):350-356.

Fields M.L., Hamad A.M. y Smith D.K. (1981) Natural lactic acid fermentation of corn meal. Journal of Food Science. 46:1220-1229.

Friedman, M., Zahnley, J. C. y Masters, P. (1981). J. Food Sci 48:127 (citado por Sánchez Mejorada, 1982).

Gopalan, C. y Kamala, S. J. R. (1975). Vitamins and Hormones, 33:505 (citado por Sánchez Mejorada, 1982).

Gómez M.H., Mc Donough C.M., Rooney L.W. y Wanistka R.D. (1989) Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. Journal of food science. Vol 24. 2:331-336.

Hasseltine C. W., Wang, H. L., (1979). Fermented Foods . Chemistry and Industry. R., pp. 392-399.

Hayashi, R. y Kameda, I. (1980). Agric. Biol. Chem., 44:127 (Citado por Sánchez Mejorada, 1982).

Hartmann A, Fu Halan, Burris R (1986) Influence of Amino Acids on Nitrogen Fixation Ability and Growth of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology, vol. 54, (1):87-93.

Herrera, T. y Ulloa, M (1970). Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 12 :103-108

Herrera T, Taboada J, Ulloa M, (1972). Fijación de nitrógeno en el tesguino y el pulque. An. Inst. Biol. Universidad Nacional Autónoma de México 43. Ser. Biol. Exp.1:77-78.

Jensen, V. y Holl, E. (1975) Associative Grwth of Nitrogen Fixing Bacteria With Other micro-organisms. En Nitrogen Fixation by Free living micro-organisms. 1th Ed W. D. P. Cambridge University Press. Cambridge, G. Britain.

Jakson D.S., Choto-Owen C., Waniska R.D., Rooney L.W. (1988) Characterization of starch cooked in alkali by aqueous high performance Size-Exclusion chromatography. Cereal Chem. 65(6): 493-496.

Katz.S.H., Hediger.M.L., Valleroy.L.A. (1974) Traditional Maize Processing Techniques in the New World. Science, Vol. 184:765-773.

Lappe P. (1988) Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesguino Tarahumara. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México. D.F. 165 pp.

Leal H., M.C. Wachter, E Alvarez, López A, C. Sain-Phard.(1987) Estudio de cambios en el contenido proteico de subproductos agrícolas por fermentación con microfloras mixtas. Memorias del Simposio Latinoamericano de Biotecnología para la Producción de Biomasa y Tratamiento de desperdicios. Antigua, Guatemala. p. 289-304.

Lowry.O.H., Rosebrough N.J.,Farr.A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin reagent. J.Biol. Chem. 193:265-275.

Marecková H. (1983). Bacteria for Nitrogen Fixation. Cap 2 en Biotechnology, A Comprehensive Treatise Rehm H.J., Reed G. (eds) Vol 3. Verlag Chemie. República Federal de Alemania. p. 219-231.

Marshall V.M.E.,Law B.A. (1984) The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria En: Davies L.F., Law B.A. (eds) Advances in the Microbiology and Biochemistry of cheese and Fermented Milk. Elsevier Applied Science Pub. Londres y Nueva York. p 67-98.

Mulder, E.G. (1975). Phisiology and Ecology of Free Living. Nitroge-Fixing Bacteria. En Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. 1th ed. Stewart, W. D. P. Cambridge University Press . G. Britain.

Muñoz.D. y Viniegra.G. (1981)Fijación de nitrógeno atmosférico por cultivo mixto de una bacteria láctica y *Azotobacter chroococcum*. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 23:213-217.

Nakayama,K. (1981) Source of industrial microorganisms En: Biotechnology H.J. Rhem y G. Reed (eds). Microbial Fundamentals. Vol 1 UCH Publishers. República Federal de Alemania.

Nuraida L. (1988) Studies on microorganism isolated from 86
pozol, a Mexican fermented maize dough. Tesis de Maestría en
Ciencias en Microbiología de Alimentos. Universidad de Reading,
Gran Bretaña. 80 pp.

Paredes-López, O., Saharópulos, M.E. (1982) Scanning
electron microscopy studies of lime corn kernel for tortilla
making. J. Food. Technol. (17), 657-693.

Paredes-López O y Saharópulos M.E. (1981) Cong Tec Alim (12),5
(Citado por Paredes-López & Saharópulos 1983)

Pomeranz Y (1987) Modern cereal Science and Technology. V.C.H.
Publishers N.Y.

Ramírez, J.F., (1987). Biochemical Studies on a Mexican
Fermented corn food-pozol. Tesis de Doctorado en Ciencia de los
Alimentos Universidad de Cornell, Estados Unidos. 173 pp.

Robelo A.C. (1948) Diccionario de aztequismos. Ediciones Fuente
Cultural. México-Ruiz E.E. 191444. El cultivo del maíz. Imprenta de
la Secretaría de Fomento. México. p 294-296.

Rose, A. H. (1977) Microbiología Química. 2a ed. Alhambra.
Madrid, España. 312-315.

Rosenblum, E.D. y Wilson P.W. (1949) Fixation of isotopic
nitrogen by *Clostridium*. J. Bacteriol. 57:143-414. (Citado en
Sneath et al., 1986).

Salunke, D. K., Chavan, J. Kadam, S. S., (1985) Postharvest
Biotechnology of Cereals. C.R.C. Press, Inc. Florida.

Sánchez Mejorada Martínez del Sobral (1982) Cambios en la
Proteína del maíz durante la nixtamalización. Tesis de Maestría en
Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química.
U.N.A.M., México. 99 pp.

Sanderson J., Wall J.S., Donalson G.L. y Cavins J.F. (1978)
Effect of alkaline processing of corn on its amino acids. Cereal
Chemistry 55:204-213. (Citado por Boyer 1987).

Sandstead, H.H., et al. (1987). Influence of dietary fiber on
trace element balance. Am. J. Clin. Nutr. 31:S180.

Salinas, Ch. (1958) Etnobiología e introducción a la
bacteriología del pozol. Tesis profesional. Fac. Ciencias. UNAM.
Pp 1-16.

Schlegel G. (1988) General Microbiology., Cambridge University
Press., Sixth Edition.

Sidney Williams Ceds) (1984) Official Methods of Analysis 14
ed Association of Official Analytical Chemist, Inc Arlington USA.

Smeth P.H.A., Mair N.S., Sharpe y Holt J.G. (1988). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 2. William & Wilkins. Baltimore USA.

89

Sternberg M. Kim C. y Plankett R.A. (1975) Lysinoalanine Determination in Proteins. *Journal of Food Science* 40:1168-1170.

Summer, J.B. y Howell, S.F. (1935) A method for determination of saccharosa activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54.

Taboada, J. y Herrera, T. (1972) Efecto de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno por *Agrobacterium azolophilum*. *An. Inst. Biol. U.N.A.M.* 43, Serie. Biología. Experimental. Pp. 35 a 42.

Tongnual, P. Nanson, N.J. y Fields, M.L. (1981). Effect of proteolytic bacteria in the natural fermentation of corn to increase its nutritive value. *J. Food. Science* 46:100,104-109.

Ulloa M. (1974) Mycofloral Succession in pozol from Tabasco, México., *Biol. Soc. Mex. Mic.* 8.

Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. (1987) Fermentaciones tradicionales indígenas de México. No. 16, Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista. México.

Ulloa, M. y Herrera T. (1982) Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesquino, pulque, colonche y tepache. *An. Inst. Biol. Universidad Nacional Autónoma de México. Series Botánicas* 43,53:145-163.

Ulloa, M., Herrera T. y Taboada, J. (1983). Pozol, a fermented maize dough. En Steinkraus, K, Dekker M. (eds) "Handbook of Indigenous Fermented Food", vol. 9. Microbiology series. Inc. Nueva York y Basel, E.U.A. p. 189-238.

Wall, J. S. y Paulis, J. W. (1978). Advances in cereal Science and Technology. Vol. 2, p. 137 (ed. Y. Pomeranz) American Association of Cereal Chemist, St Paul, U.S.A. (Citado por Paredes-López y Sahápulos, 1982).

Wang, H. L., Fang, S. F., (1986). History of Chinese Fermented Foods. En "Indigenous Fermented Food of non Western Origin", 23-35 Editores Cramer W. Hesseltine and H. L. Wang. J. Cramer, Berlin-Stuttgart.

Watson, A.S., (1987) Structure and composition. en Watson, A.S., Ramstad, E.P. (eds) *Corn: Chemistry and Technology* American Association of Cereal Chemists Inc. Minnesota USA. Pp 53-80.

Wiegel, J & Schegel (1977) Leucine biosynthesis: effect of branched chain amino acids and threonine on a-isopropylmalate synthetase activity from aerobic and anaerobic microorganisms. *Biochem. Syst. Ecol.* 5:169-178. (Citado en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 2 1986).

Wilson.M.C. (1987) Proteins of the kernel. en Watson.A.S.,
Ramstad.E.p. Ceds) Corn:Chemistry and Technology. American
Associatio of Cereal Chemists Inc. Minnesota USA. Pp 273-309.