

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**“FERMENTACION LACTICA DE MATERIALES FECULENTOS
PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS PARA
MONOGASTRICOS”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

MARIA ELISA ISABEL ALVAREZ SUAREZ

MARIA AMPARO LOPEZ RODRIGUEZ

1 9 8 7



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

RESUMEN	1
JUSTIFICACION	2
OBJETIVO	5
I. GENERALIDADES	
1.1. Fermentación láctica	13
1.2. Fermentaciones lácticas tradicionales	16
II. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION	
2.1. Microorganismos	22
2.2. Materias primas	22
2.3. Preparación de las materias primas para los medios de fermentación	24
2.3.1. Preparación de los granos de maíz y sorgo por nixta- malización o cocción	24
2.3.2. Preparación de col y plátano	25
2.4. Medios de cultivo	26
2.4.1. Medio líquido 77 de Fred y Waksman básico	26
2.4.2. Medio 77 de Fred y Waksman modificado	26
2.4.3. Medio de cultivo para microflora mixta de pozol	26
2.4.4. Medios de fermentación	26
2.4.4.1. Suspensiones diluídas (en tubos)	27
2.4.4.2. Suspensiones concentradas (en matraces)	27
2.4.4.3. Medio semisólido empacado en forma esférica	28
2.5. Preparación de inóculos	29

2.5.1. Cultivo de microflora mixta de pozol	29
2.5.2. Cultivo de <i>Agrobacterium azotophilum</i>	29
2.6. Inoculación de los medios de fermentación	30
2.6.1. Suspensiones diluídas	30
2.6.2. Suspensiones concentradas	30
2.6.3. Medio semisólido empacado en forma esférica	30
2.7. Toma de muestras	31
2.8. Determinaciones analíticas	31
2.8.1. pH	31
2.8.2. Acidez titulable	31
2.8.3. Humedad	32
2.8.4. Proteína (Método de Mikrokjeldahl)	32
2.8.5. Cenizas	34
2.9. Método matemático de diseño experimental de Box-Wilson	35

III. RESULTADOS

3.1. Estudio de la fermentación del pozol, aplicando el método de diseño experimental de Box-Wilson	43
3.2. Influencia individual de los parámetros en la fermentación del pozol en harina de maíz nixtamalizado	59
3.2.1. Influencia del contenido inicial de proteína	61
3.2.2. Influencia de la fuente de nitrógeno	61
3.2.3. Efecto de la adición de grasa	66
3.2.4. Efecto de la adición de cocca	66
3.3. Estudio de la fermentación del pozol en sustratos de diferentes fuentes de maíz nixtamalizado.	70

3.3.1. Efecto del contenido inicial de proteína	71
3.3.2. Efecto de la fuente de nitrógeno	76
3.3.3. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque	76
3.3.4. Influencia de las condiciones de fermentación	79
3.4. Fermentación del pozol sobre distintos sustratos amiláceos	84
3.4.1. Efecto del contenido inicial de proteína	85
3.4.2. Efecto de la fuente de nitrógeno	90
3.4.3. Influencia de la temperatura de incubación	93
3.4.4. Efecto de la inoculación	96
3.4.5. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque	98
3.4.6. Efecto de la nixtamalización	101
3.4.7. Fermentación de sustratos de almidón y de éste con gluten de maíz	104
3.4.8. Fermentación de sustratos preparados con harina de maíz nixtamalizado y plátano	106
3.4.9. Fermentación de sustratos preparados con harina de maíz nixtamalizado y col	109
3.5. Balance de materia y nitrógeno	112
IV. DISCUSION DE RESULTADOS	117
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
VI. BIBLIOGRAFIA	139

RESUMEN

El enriquecimiento proteico por medio de la fijación de nitrógeno podría mejorar el valor nutritivo de diversos productos y desechos agrícolas con bajos niveles de nitrógeno. El pozol es un producto preparado por fermentación de masa de maíz nixtamalizado, en donde se presenta fijación de nitrógeno.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes parámetros ambientales sobre el aumento en el contenido de proteína debida a microorganismos del pozol, tales como: sustrato, pH, relación C/N, fuente y contenido inicial de nitrógeno, temperatura, aereación, nixtamalización, forma del medio de fermentación e inoculación. Estos efectos se midieron mediante determinaciones del valor del pH, acidez titulable, contenido de proteína, humedad y balance de materia y nitrógeno.

Se encontró que, entre todos los materiales utilizados, solo hubo aumento en el contenido neto de proteína en el maíz nixtamalizado, por lo que aparentemente su composición es un factor importante en este proceso. Es preferible utilizar medios de fermentación en forma de masas esféricas, inocular con yoghurt e incubar a 28°C, permitiendo que el pH disminuya durante la fermentación sin controlarlo. La fijación de nitrógeno es mucho mayor cuando se utiliza caseína como fuente de nitrógeno, en concentraciones iniciales de, al menos, un 15%.

JUSTIFICACION

Un problema capital de nuestra época es el proporcionar una dieta adecuada, equilibrada y aceptable a grandes sectores de la población mundial. Dada la carencia de alimentos, es necesario que se apoyen e intensifiquen investigaciones que tiendan a aumentar su disponibilidad.

Los granos de cereales han representado una de las fuentes más importantes de alimentos, tanto para la población humana como en la alimentación animal. Aunque muchos cereales son deficientes en uno o más de los aminoácidos esenciales, especialmente en lisina, treonina y triptofano (17), pueden ser enriquecidos mediante suplementación, procedimiento que, no obstante, implica aumentos sustanciales en los costos. Los cereales enriquecidos por ésta u otras técnicas resultan en una fuente nutricia más adecuado.

Debido al costo relativamente bajo de este tipo de productos, se ha presentado un aumento continuo del consumo de cereales en la alimentación animal en detrimento de la alimentación humana. Resulta, por ello, de enorme importancia intensificar las investigaciones especialmente en dos áreas:

- a) Hacer un uso más eficiente de los cereales que no se pueden utilizar en la alimentación humana como el sorgo, para la alimentación animal.
- b) Mejorar el valor nutritivo por medio de aumentos en el contenido proteico de los diversos productos y desechos agrícolas, caracterizados por su alto contenido de hidratos de carbono de fácil asimilación, pero con bajos niveles de nitrógeno, para canalizarlos a la alimentación animal en susti-

tución de cereales actualmente utilizados.

Se ofrecen varias alternativas para lograr estos objetivos, habiéndose realizado investigaciones desde hace algunos años en las áreas mencionadas, con particular énfasis en el aspecto de enriquecimiento proteico. Entre éstas se pueden citar las de Gregory et al. (13), que estudiaron la conversión de yuca en proteína microbiana para utilizarla en la alimentación animal y las de Senez (34) y posteriormente, Raimbault (29), que desarrollaron una fermentación sólida para el enriquecimiento proteico de materiales amiláceos como yuca, papa, plátano y desperdicios de plátano y papa, utilizando *Aspergillus niger*. El inconveniente de estas fermentaciones aerobias de carbohidratos es que el contenido neto de proteína aumenta poco significativamente ya que, aunque el incremento en el porcentaje de proteína es grande, lo que ocurre es que el contenido de carbohidratos disminuye, además, el requerimiento de aereación hace al proceso más costoso y la preservación es nula.

Una alternativa que se ofrece interesante y que permitiría atacar a las dos áreas de investigación propuestas anteriormente, tiene como punto de partida el enriquecimiento proteico por medio de fijación de nitrógeno, que ha sido reportado en dos de las fermentaciones de alimentos tradicionales de México: el pozol y los tíficos (42, 43). Este aspecto no se ha estudiado con detalle hasta la fecha. Estudios preliminares realizados en el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (19) hacen pensar que el pozol es una fermenta-

ción de tipo láctica. Se sabe desde hace mucho tiempo que en las fermentaciones lácticas se presenta un aumento en el contenido de diversas vitaminas y en la disponibilidad de ciertos aminoácidos. En el caso del pozol, se ha informado el aislamiento de dos bacterias, el *Agrobacterium azotophilum* y el *Aerobacter aerogenes*, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (46). Hasta la fecha no se han definido con detalle el grado máximo de fijación de nitrógeno en este tipo de fermentación, ni el efecto que los diferentes parámetros ambientales tienen sobre ella.

OBJETIVO

El objetivo general de la presente investigación es determinar los factores que influyen en la fermentación láctica del pozol con fijación de nitrógeno, para lograr, en un futuro, adaptarlo a un proceso de enriquecimiento con otro tipo de cereales, así como, a diferentes productos y desechos agrícolas ricos en almidones y carbohidratos de fácil degradación.

CAPITULO I

GENERALIDADES

I. GENERALIDADES

Para empezar a definir los parámetros de la fermentación del pozol y sus posibles aplicaciones, se requiere investigar con detalle los diferentes aspectos involucrados en la preparación de alimentos fermentados, donde se ha detectado fijación de nitrógeno, así como, las diferencias existentes con otros productos fermentados preparados de materias primas similares, pero donde no se produce fijación de nitrógeno.

En comparación con los alimentos fermentados de Asia y Africa, los tradicionales de México se han estudiado relativamente poco. Del pozol se sabe que es un producto alimenticio de origen maya. Se prepara por fermentación de masa de maíz nixtamalizado, compactada en forma de bolas de diversos tamaños, que van de 10 a 12 cms de longitud y de 5 a 8 cms de ancho.

Para su consumo, las bolas de pozol con diferentes grados de fermentación se diluyen con agua para obtener una suspensión, que es bebida como alimento básico en la dieta diaria de grandes comunidades de indios y mestizos, principalmente en los Estados del Sureste de México, como Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, y en menor escala, en Veracruz y Oaxaca.

El tiempo de fermentación en el pozol tradicional es de 1 a 5 días o más; algunos grupos indígenas, como los lacandones y chamulas, dejan fermentar el pozol dos o más semanas y lo consumen enmohecido. El pozol diluido en agua en proporción de 1:2 ó 1:3, es bebido sólo o con sal, azúcar, miel o

diversas clases de chiles secos, tostados y molidos. El chorote es una variedad de pozol de Tabasco, en la que se añaden semillas de cacao molidas a la masa de pozol recién hecha. Los lacandones utilizan pozol mezclado con agua y miel para reducir la fiebre. También se consume para controlar la diarrea u otras infecciones intestinales. Las bolas de pozol cubiertas de hongos se han utilizado desde hace mucho tiempo como cataplasmas para curar infecciones superficiales y heridas. Por otro lado, se ha corroborado, *in vitro*, el efecto antagónico del pozol sobre diferentes especies de bacterias, hongos y levaduras, muchos de los cuales son patogénicos o potencialmente patogénicos para el hombre (46).

El pozol se prepara domésticamente para consumo familiar o en una escala comercial pequeña, de acuerdo con los procedimientos tradicionales. Las etapas son las siguientes: las mazorcas de maíz se descascaran y los granos se cuecen una hora en agua (1:2), a la que se le ha añadido un 1% de hidróxido de calcio (p/v). Cuando los granos están hinchados y sus pericardios se desprenden fácilmente, se cuecen, se lavan con agua y escurren, para obtener el nixtamal. Este se muele en un molino mecánico manual hasta obtener una masa, a la cual se le da forma de bolas manualmente. Las bolas se envuelven en hojas de plátano para evitar la deshidratación y se fermentan de uno a catorce días, dependiendo del gusto del consumidor y de las circunstancias prevalecientes. En la figura 1.1 se presenta el diagrama de flujo de la elaboración del pozol (35).

El primer estudio científico sobre el pozol lo realizaron Cravioto et al.

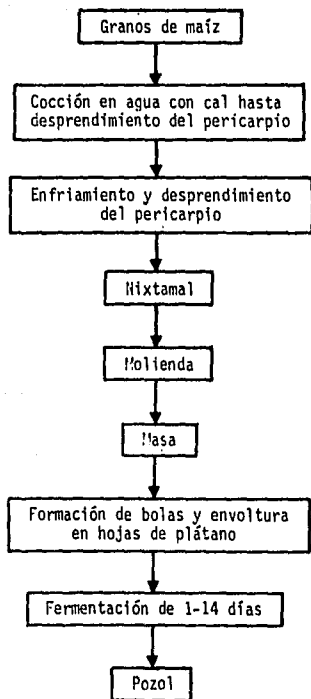


Figura 1.1 Diagrama de flujo de la elaboración del pozol

(9), en el que hicieron un análisis químico comparativo entre éste y los granos de maíz utilizados en su preparación. Encontraron un aumento de nitrógeno proteico de algunos aminoácidos, como lisina y triptofano, y en vitaminas, como niacina y riboflavina, durante la fermentación; sin embargo, otros nutrimentos, como la tiamina y el fósforo, disminuyeron. También comprobaron un aumento de peso en ratas blancas alimentadas con pozol que en las alimentadas con granos.

Salinas (33) realizó el primer estudio microbiológico del pozol, encontrando dos especies de bacterias: *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*.

Ulloa (42) estudió la sucesión de la microflora del pozol de Tabasco. En este estudio se observó que la mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se destruyen en la nixtamalización y es, después de este proceso, cuando la masa se inocula. Debido a que no hay higiene en quienes preparan las masas, las fuentes de inoculación son diversas; sin embargo, hay varias especies de levaduras y hongos que se encuentran siempre presentes en pozoles de diferentes lugares, preparados a diferentes tiempos. Durante las primeras horas de fermentación siempre hay en el pozol *Geotrichum candidum*, *Trichosporium cutaneum* y varias especies de *Candida*. Cuando las bolas de pozol alcanzan progresivamente valores de pH más bajos y se secan, se encuentran hongos como *Cladosporium cladosporoides* o *C. herbarum*, *monilia sitophila* y *Mucor rouxianus* o *M. racemosus*. Durante las primeras etapas de la fermentación las bacterias superan en número a las levaduras y hongos

y son probablemente las responsables en su mayor parte de la producción de ácido durante las primeras 24 horas, cuando el pH baja de 7 a 5. Se han aislado un buen número de especies bacterianas, cuya importancia en la fermentación es desconocida. Se encuentran entre ellas, bacterias fijadoras de nitrógeno, que pueden ser las responsables del aumento de nitrógeno total. Asimismo, algunas de las bacterias aisladas se han asociado previamente con envenenamientos humanos o descomposición de alimentos (35). En la Tabla 1.1 se indica una relación de los microorganismos que han sido identificados en las diferentes muestras de pozol estudiadas.

Uno de los microorganismos más importantes es el *Agrobacterium azotophilum*, el cual fija nitrógeno atmosférico, tanto anaeróbica como aeróbicamente. Es un bacilo cocoide, gram negativo y no ácido resistente; produce ácido pero no gas en medios de glucosa, sacarosa y xilosa; mientras que no produce ácido ni gas en galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, dextrina, almidón, inulina y glicerol. El cloruro de amonio le puede servir como única fuente de nitrógeno. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C y presenta un crecimiento raquíptico o nulo a 37°C (44). En algunas muestras de pozol se aisló otro microorganismo fijador de nitrógeno, el *Aerobacter aerogenes*. Ambas especies de bacterias fijan nitrógeno en diversos medios cuando se cultivan mezcladas o individualmente (35). El *Agrobacterium azotophilum* ha mostrado una característica adicional, ya que produce, *in vitro*, diferentes grados de antagonismo sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus*, *A.*

TABLA 1.1

MICROORGANISMOS DE LA MICROFLORA DEL FOZOL (46)

BACTERIAS:

*Agrobacterium azotophilum**
Achromobacter pozolis
Escherichia coli var. *neapolitana*
Pseudomonas mexicana
*Aerobacter aerogenes**

LEVADURAS:

Candida krusei
Trichosporum cutaneum
Hansenula fabianii
Kluyveromyces fragilis
Candida guilliermondii var. *guilliermondii*
Candida tropicalis
Saccharomyces cerevisiae
Candida parapsilosis

MOHOS:

Geotrichum candidum
Aureobasidium pullulans
Epicoccum sp.
Mucor racemosus
Fusarium moniliiforme
Paezilomyces fumosoroseus
Mucor rouxianus
Rhizopus stolonifer
Trichoderma viride
Alternaria tenuis
Aspergillus flavus
Aspergillus parasiticus
Cladosporium cladosporioides
Cladosporium herbarum
Monilia sitophila
Penicillium claviforme
Penicillium cyclopium
Penicillium expansum
Penicillium lanoso-viride
Phialophora richardsiae

* Bacterias fijadoras de nitrógeno

terreus, *Geotrichum candidum*, *Monilia sitophila*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride* (35); además de las siguientes especies de *Penicillium*: *claviforme*, *cyclopium*, *expansum*, *italicum* y *lanoso-viride* (45). Todavía no se conoce la naturaleza química de la(s) sustancia(s) que produce(n) tal antagonismo. La presencia de sustancias antifúngicas se puede suponer del hecho de que los hongos generalmente no invaden al pozol durante los primeros días de fermentación (35).

Como se puede observar en la Tabla 1.1, se han aislado del pozol también especies patogénicas o potencialmente patogénicas como son: *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Phialophora richardsiae*. Se ha visto que si el maíz usado está contaminado con las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, la mayoría se destruyen durante la nixtamalización, pero las que quedan permanecen durante la fermentación.

No se ha estudiado con detalle la bioquímica de la fermentación del pozol; sin embargo, los resultados de las investigaciones de Tongnual et al. (39) sobre la fermentación anaerobia de suspensiones de maíz molido y la similitud de condiciones de esta fermentación con la del pozol, hacen suponer que ésta es de tipo láctica, específicamente homoláctica.

1.1. Fermentación láctica

La fermentación láctica se emplea principalmente para la conservación y producción de alimentos. Sus efectos conservadores se pueden atribuir a

los cambios químicos, como la producción de ácidos (láctico y acético, principalmente), que producen un medio desfavorable para el desarrollo de microorganismos patógenos y putrefactivos (50).

Se ha reportado que la fermentación láctica da como resultado un aumento general en el valor nutritivo del material fermentado. Así, la calidad proteica de los granos de cereales es incrementada debido al aumento de la disponibilidad de los aminoácidos limitantes, de acuerdo al reporte de Tongnual et al. (39), que indica el aumento en la disponibilidad de lisina, triptofano y del valor nutritivo relativo en la fermentación láctica del maíz; y al de Tongnual y Fields (38), para la mezcla del frijol de soya y maíz. Los cambios en el contenido de lisina, tiamina y riboflavina en granos y leguminosas fermentados también fueron estudiados, observándose que la riboflavina generalmente tiende a aumentar, mientras que la tiamina y la niacina a disminuir (37, 51, 7, 16). El contenido de vitamina B₁₂ en el maíz aumenta significativamente con la fermentación, al igual que el ácido pantoténico (23).

Hamad y Fields (14) realizaron un estudio comparativo entre la fermentación láctica y la germinación de cereales, encontrando que el aumento producido es similar, en términos generales, para ambos procesos. Sólo en la disponibilidad de la lisina se registra un aumento mayor con la germinación que con la fermentación de trigo y cebada, mientras que el aumento es menor en la germinación que en la fermentación de arroz y avena.

Otro efecto causado por la fermentación es sobre el contenido de ácido fítico, el cual inhibe las amilasas y disminuye la disponibilidad de cationes como el Ca^{++} , el Mg^{++} , el Zn^{++} , el Fe^{++} y el Fe^{+++} , formando complejos insolubles en semillas y leguminosas. López et al. (18) reportaron una disminución significativa en los niveles de ácido fítico en el maíz con la fermentación; y Reddy y Salunkhe (30), en el frijol y arroz.

Existen diversos factores que influyen sobre la bioquímica de las fermentaciones. Yildiz y Westhoff (50) estudiaron el efecto de los microorganismos en la fermentación láctica de jugo de col, encontrando que ésta es más favorecida cuando se utiliza una mezcla de bacterias lácticas que cuando se utilizan éstas por separado. Nanson y Fields (24) llegaron a la misma conclusión con una fermentación de maíz, indicando que cada microorganismo tiene diferentes enzimas que permiten una mayor proteólisis o síntesis en la fermentación. En las fermentaciones espontáneas con cultivos mixtos se ha observado que el sustrato utilizado influye decisivamente sobre el tipo de metabolitos producidos. La proporción C/N es un factor determinante. Moon (21) demostró que con una relación C/N de 20-25 se favorece la fermentación láctica. En términos generales, se puede afirmar que una relación C/N mayor a 60 favorece la fermentación alcohólica, mientras que si es menor a 30 favorece la láctica (49).

La producción de ácido láctico también depende del pH del medio. Gómez (11) encontró que a un pH cercano a la neutralidad, la fermentación es láctica e independiente del tipo de fuente de nitrógeno. La interacción del pH y de

la fuente de nitrógeno es determinante en la orientación de la fermentación; si la fuente de nitrógeno es inorgánica, para que la fermentación sea láctica se necesita un pH de 6.5, mientras que si el nitrógeno es proteico, el intervalo de pH es muy amplio, por debajo de la neutralidad (12).

Por otra parte, la concentración de oxígeno presente puede determinar la concentración de los productos obtenidos, debido a que la aereación hace que se produzca una mayor concentración de acetatos que de lactatos (8, 36).

1.2. Fermentaciones lácticas tradicionales

Casi todos los países tienen un alimento fermentado típico de tipo láctico, donde el valor nutritivo se ve aumentado y la conservación es mayor. Por lo general, requiere de métodos de bajo costo y su sabor y textura es agradable. La mayoría de estos alimentos utilizan como sustratos cereales y otros productos amiláceos y se inoculan espontáneamente en su preparación (35). Entre los más importantes se pueden citar el natto de Japón, el dagé de Indonesia, el igli de la India, el ogi y el gari de Nigeria, el uji de Kenia, el mahewu de Sudáfrica, el kenkey de Ghana y, en México, el pozol y el tesgüino. Tanto el ogi como el kenkey, el agidi, el pozol y el tesgüino se preparan a partir de granos de maíz. De todos estos productos sólo se han aislado bacterias fijadoras de nitrógeno del pozol y de los tísticos, que son masas gelatinosas que se desarrollan en los frutos de nopales, jugos de fruta como la piña o en agua azucarada (32). El pozol es

el único que se prepara a partir de maíz nixtamalizado y el que mayor aumento en el contenido de proteína alcanza, mientras que en el ogi y en el agidi el contenido de proteína disminuye, debido al proceso de molienda del maíz. Sin embargo, el pozol tiene menor cantidad de tiamina en relación al maíz, mientras que el ogi y el agidi presentan una mayor cantidad (35).

Los microorganismos involucrados en la fermentación de ogi son: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Pediococcus gunther*, *P. pentosaceus* y *Candida spp.*, principalmente. Los ácidos predominantes son el láctico (0.6%), acético (0.1%) y butírico (menos de 0.02%). El ácido fítico se hidroliza completamente (22).

El kenkey se presenta en bolas de masa envueltas en hojas de plátano. Umoh y Muller (2) encontraron que en la fermentación de kenkey, si se le añade un 1% de trigo a la masa de maíz, el 99% del ácido fítico se destruye en 36 horas de fermentación.

El agidi se presenta en forma de tortas de maíz, sorgo o mijo fermentadas. Umoh y Fields (47) elaboraron agidi en el laboratorio y lo compararon con el tradicional, encontrando que el primero tenía un contenido más alto en triptofano y lisina, pero era menos aceptado sensorialmente.

El tesguino se prepara a partir de granos de maíz germinados, al que se le añaden diversas plantas como catalizadores. Es una bebida embriagante propia de los indios tarahumares. También se puede preparar a partir de tallos

de maíz. Se han identificado *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida* y *Bacillus megaterium*. Contiene más proteína que las otras bebidas fermentadas de México, excepto el pozol (46).

Entre los alimentos tradicionales fermentados hechos a partir de cereales diferentes al maíz y de otros productos amiláceos se encuentran el ogi de sorgo y de mijo, el tef y el gari. Akingbala et al. (1) estudiaron las propiedades sensoriales y fisicoquímicas del ogi de sorgo de diferentes características de semilla, encontrando que éste no influye en la fermentación.

Gashe (10) realizó estudios bacteriológicos durante la fermentación del tef, alimento fermentado de Etiopía, elaborado a partir de harina de tef (*Eragrostis tef*), en donde la fermentación es iniciada por *Enterobacter enterobacteriaceae* y seguida por *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus faecalis*. Cuando el pH se reduce hasta 4.7, los microorganismos predominantes son *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* y *L. fermentum*.

El gari se prepara a partir de yuca y su sabor característico es producido por *Lactobacillus plantarum*. Es bajo en proteínas, minerales y vitaminas, pero es una buena fuente de calorías, debido a la gelatinización y dextrinización del almidón, lo cual lo hace más digerible (35).

Se han realizado escasos estudios sobre los alimentos tradicionales fermen-tados no comercializados. Existen algunos factores que limitan la aplicación de los conocimientos científicos para la producción de alimentos fermentados tradicionales a gran escala, como son las costumbres en la preparación y las condiciones ecológicas. Okaford (25) propuso el aislamiento e identificación de los microorganismos, determinación de las funciones de éstos, selección y mejoramiento de dichos microorganismos y control del proceso, producción a escala piloto y a nivel industrial. Ulloa (43) concluyó que la presencia de diferentes microorganismos en estos alimentos depende de los ingredientes usados, las modalidades del proceso y las condiciones ecológicas. En la mayoría de los casos, los microorganismos producen cambios favorables en textura, olor, conservación y propiedades nutritivas, pero pueden existir microorganismos patógenos o que proporcionen características indeseables.

CAPITULO II

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

II. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

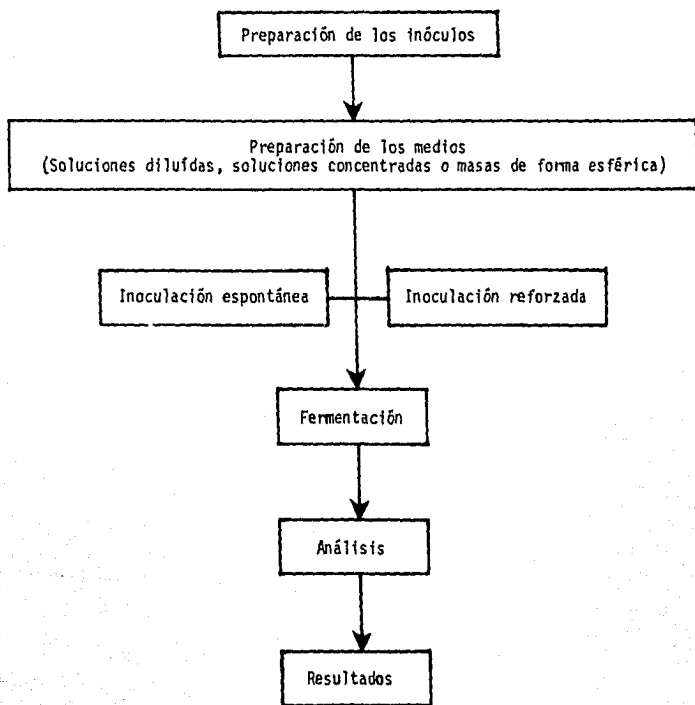


Figura 2.1. Diagrama de flujo de la metodología de la investigación

A continuación se detalla la metodología utilizada

2.1. Microorganismos

Los cultivos microbianos utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química (UNAM). Se recibió un cultivo de microflora mixta de pozol, sembrado en una suspensión al 6% de harina de maíz nixtamalizado industrializada en agua, el cual fue originalmente obtenido a partir de pozoles de Tabasco y Chiapas. Un segundo cultivo recibido fue de *Agrobacterium azotophilum*, sembrado en medio sólido 77 de Fred y Waksman. Con un asa estéril, en condiciones asépticas, se transfirió una pequeña cantidad de cultivo mixto del pozol original a 350 ml de medio de cultivo estéril para microflora mixta de pozol. Separadamente, se transfirieron aproximadamente 10 colonias de *Agrobacterium azotophilum* a 350 ml de medio líquido 77 de Fred y Waksman. Los medios inoculados se incubaron a 28°C (Ver 2.4.1. y 2.4.3.).

Para mantener la viabilidad de ambos tipos de cultivo, se sembraron una vez al mes en sus respectivos medios líquidos, añadiéndoles un 10% en volumen de los cultivos precedentes.

2.2. Materias primas

Como fuente de carbono para los experimentos de fermentación se utilizaron

diferentes materias primas de manera individual o combinada:

Almidón industrializado

Harina de maíz nixtamalizado industrializada

Sorgo con alto y bajo contenido de taninos, nixtamalizado y sin nixtamalizar

Tres diferentes tipos de maíz: maíz mejorado V-524, maíz criollo "Tuxpeñito", ambos de la zona de Acozocauhtla, Chiapas y maíz mejorado TC 85 AR del Estado de Guerrero; nixtamalizados y sin nixtamalizar

Los cereales fueron proporcionados por la Coordinación Maíz Zona Centro y Coordinación Sorgo del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de la Universidad de Chapingo

Gluten de maíz

Col y plátano verde tipo Tabasco

Yoghurt natural

Como fuente de nitrógeno se utilizó:

Caseína

Cocoa en polvo

Peptona de soya

Gallinaza

Sulfato de amonio

Urea

Harina de soya integral

Se utilizaron dos tipos de grasa:

Aceite de maíz

Manteca de cacao

Vitaminas:

Se utilizó una mezcla vitamínica que contenía: vitamina A (2000 IU), vitamina D (200 IU), vitamina E (10 IU), menadiona (0.5 mg/100 g), colina (200 mg/100 g), ácido p-aminobenzóico (10 mg/100 g), inositol (10 mg/100 g), niacina (4 mg/100 g), D-pantotenato de calcio (4 mg/100 g), riboflavina (0.8 mg/100 g), tiamina (0.5 mg/100 g), piridoxina (0.5 mg/100 g), ácido fólico (0.2 mg/100 g), biotina (0.04 mg/100 g) y vitamina B₁₂ (0.003 mg/100 g).

Minerales:

Cloruro de sodio

Hidróxido de calcio

Carbonato de calcio

2.3. Preparación de las materias primas para los medios de fermentación

2.3.1. Preparación de los granos de maíz y sorgo por nixtamalización o coc ción

La nixtamalización de los granos de cereales fue realizada en el laboratorio. Para ello, por cada parte en peso de grano, se adicionaron tres partes de una solución al 1% de agua con cal. Posteriormente, se les sometió

a cocimiento durante media hora, en el caso del maíz, y durante 15 min, en el del sorgo, dejándose en remojo en esta misma solución durante 15 hrs el maíz, y 12 hrs el sorgo. Después se frotaron los granos hasta el desprendimiento del pericarpio, se lavó con agua y se molió en un molino eléctrico Marver 10012. En el experimento V, se estudió la importancia de la nixtamalización en la fermentación del maíz, variando los tiempos de cocción y remojo (Tabla 2.5.).

Cuando los granos se utilizaron sin nixtamalizar, se siguió el mismo procedimiento, pero sin agregar cal al agua.

2.3.2. Preparación de col y plátano

La col se lavó, quitándosele las hojas superficiales, se cortó con un cuchillo y se molió en licuadora, colocándose en charolas metálicas y se secó en una estufa a 100°C. Ya seca, se molió en licuadora para alcanzar una mayor homogeneidad.

El plátano verde (tipo Tabasco) se peló y molió en una licuadora. Se colocó en charolas metálicas y se secó en una estufa a 100°C, volviéndose a moler en licuadora.

2.4. Medios de cultivo

2.4.1. Medio líquido 77 de Fred y Waksman básico

Las siguientes sustancias: K_3PO_4 (0.5 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g); NaCl (0.2 g) y almidón (10 g), se disuelven en 1000 ml de agua destilada y, antes de esterilizar el medio, se ajusta el pH a 6.8.

La esterilización se realiza en autoclave a 120°C, a una presión de 1.2 Kg/cm² durante 15 min.

2.4.2. Medio 77 de Fred y Waksman modificado

El medio 77 de Fred y Waksman básico se modificó, añadiendo 0.2 g/l de extracto de levadura y 3.55 g/l de caseína.

2.4.3. Medio de cultivo para microflora mixta de pozol

Se disolvieron 10 g de harina de maíz nixtamalizada en 1000 ml de agua destilada y se esterilizaron.

2.4.4. Medios de fermentación

Se trabajó con tres diferentes tipos de medio: suspensiones diluidas (con 6% de sólidos), suspensiones concentradas (con 20% de sólidos) y medio se

misólido (con 40-50% de sólidos).

2.4.4.1. Suspensiones diluidas (en tubos)

Los medios de suspensiones diluidas se formularon en tubos de ensaye de 30 ml de capacidad, pesando 1.2 g de la fuente de carbono, la cual fue suplementada con diversas fuentes de nitrógeno, minerales, grasas y otras sustancias, de acuerdo a como se indica en las Tablas 2.1., 2.2., 2.3., 2.4. y 2.5. Se les agregaron 20 ml de agua destilada, homogeneizándose el contenido con ayuda de un agitador eléctrico. Se inocularon, volviéndose a agitar y se cubrieron en unos casos con hule espuma y, en otros, con una película plástica impermeable a gases. Se incubaron a 28°C, a excepción del experimento V, tubos 11.1. y 11.2. (Tabla 2.5), en una estufa New Brunswick Scientific, Mod. G-27, con agitación a 250 rpm.

2.4.4.2. Suspensiones concentradas (en matraces)

Los medios de suspensiones concentradas (20% de sólidos) se formularon en matraces erlenmeyer de 250 ml con 180 ml de medio, con un total de 36 g de sólidos por matraz. Así, en los medios en que se usó harina de maíz nixtamalizado como fuente de carbono y caseína como suplemento nitrogenado, las cantidades requeridas se calcularon de tal forma, que entre ambas pesaran 36 g y la concentración de proteína inicial fuera del 15%. En los medios en que se utilizó masa de maíz nixtamalizado, se tomaron porciones de 36 g en peso seco. Después de ser inoculados los medios, se agregó el agua des-

tilada necesaria para alcanzar una humedad del 80%. Los matraces se taparon con película plástica impermeable a gases y se incubaron a 28°C en una estufa New Brunswick Scientific, Mod. G-27, con agitación a 250 rpm (Tabla 2.4.).

2.4.4.3. Medio semisólido empacado en forma esférica

Este tipo de medio se preparó con harina de maíz nixtamalizado y con las tres clases de maíz nixtamalizado. Cuando se preparó a partir de harina de maíz nixtamalizado, se mezclaron 54.31 g de ésta con 5.69 g de caseína, para que entre ambas pesaran 60 g y la concentración de proteína inicial fuera del 15%. Se le agregó agua destilada hasta obtener una masa con un peso de 150 g (60% de humedad). Al preparar estos medios a partir de maíz nixtamalizado en el laboratorio, se siguieron procedimientos diferentes para cada ocasión; en el experimento IV, se hicieron masas de maíz V-524 y de maíz criollo "Tuxpeñito", a las que se les ajustó la humedad a 55-60%, tomándose porciones de 150 g. En el experimento V, se hicieron masas de maíz TC 85 AR, ajustando el contenido de proteína inicial al 15% con urea, caseína o caseína y yoghurt, y la humedad a 55-60%, tomándose porciones también de 150 g. En estos experimentos las masas se inocularon en la mayoría de los casos. Posteriormente, se les dió forma esférica, empacándose con película plástica impermeable a gases, a la que se le hicieron pequeñas perforaciones, y se incubaron a 28°C (Tablas 2.4. y 2.5.).

2.5. Preparación de inóculos

2.5.1. Cultivo de microflora mixta de pozol

Los inóculos con la microflora mixta se tomaban de los cultivos de mantenimiento de ésta, los cuales se conservaban con resiembras mensuales.

Para determinar el momento adecuado para utilizar este material como inóculo, se seguía el siguiente procedimiento: se tomaban 10 ml de medio recién inoculado, agregándoseles unas gotas de solución saturada de cloruro de mercurio y se centrifugaban durante 10 min. a 2500 rpm. El sobrenadante se guardaba en un frasco de 5 ml bien tapado para utilizarse como blanco, con el fin de seguir el desarrollo de los microorganismos del pozol. Se tomaban muestras cada dos días, centrifugando en las mismas condiciones después de añadir cloruro de mercurio, para medir la densidad óptica del sobrenadante con respecto al blanco a una longitud de onda de 500 μ m en un espectrofotómetro Baush & Lomb. Al llegar a una transmitancia de 19-25%, se utilizó como inóculo.

2.5.2. Cultivo de *Agrobacterium azotophilum*

El cultivo de *Agrobacterium azotophilum*, para ser utilizado en los medios de fermentación, se preparó añadiendo a 350 ml de medio 77 de Fred y Waksman modificado un 10% en volumen del cultivo de *Agrobacterium azotophilum* de mantenimiento con una transmitancia de 30-40%, y se consideró apto para

la inoculación cuando llegó a una transmitancia de 8-17%, midiendo ésta en un espectrofotómetro Baush & Lomb, a una longitud de onda de 500 μ m contra su respectivo blanco, que consistía en medio sin inocular.

2.6. Inoculación de los medios de fermentación

2.6.1. Suspensiones diluídas

En condiciones asépticas y con pipetas esterilizadas, se tomaron 2 ml de cada uno de los inóculos y se adicionaron a cada tubo, excepto a los tubos 10.1., 10.2. y 10.3. del experimento V (Tabla 2.5).

2.6.2. Suspensiones concentradas

Se inocularon agregándoles 15 ml de cada inóculo, con pipetas volumétricas y en condiciones asépticas, a cada matraz (Tabla 2.4.).

2.6.3. Medio semisólido empacado en forma esférica

Se tomaron 22.5 ml de cada inóculo, centrifugándose durante 50 min a 5000 rpm. Se decantaron y el precipitado se agregó a las masas, excepto a las 3.2 y 3.3. del experimento V, las cuales no fueron inoculadas.

2.7. Toma de muestras

Para cada medio de fermentación se tenían 9 muestras en el primer grupo de experimentos (I y II) y 6 en los demás experimentos (III, IV y V), sacrificándose 3 para cada tiempo de fermentación. Las muestras se procesaron individualmente para sus determinaciones analíticas de la siguiente forma: de la muestra húmeda, se tomaron 5 g para la determinación de pH y acidez titulable y 10 g fueron secados para la determinación de humedad, proteína y, en algunos casos, cenizas.

2.8. Determinaciones analíticas

2.8.1. pH

Se colocaron 5 g de muestra en un matraz y se aforaron con agua destilada a 25 ml. Una vez agitado vigorosamente, se pasaron 10 ml a un vaso de precipitados de 25 ml y se tomó lectura en un potenciómetro Sargent-Welch, Mod. LSX, con electródo de vidrio, previamente calibrado.

2.8.2. Acidez titulable

De la muestra aforada a 25 ml, se tomaron 10 ml en un vaso de precipitados de 60 ml, agregándose 3 gotas del indicador de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.01N hasta llegar a un vire rosa pálido (4).

Cálculos:

$$\text{Acido láctico (\%)} = \frac{V \times N \times 0.09 \times 5 \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

Donde:

V = ml de hidróxido de sodio gastados

N = normalidad de hidróxido de sodio

0.09 = miliequivalentes de ácido láctico

5 = factor de dilución

2.8.3. Humedad

Se pesaron 10 g de muestra homogénea en un plato metálico especial para la determinación de humedad, colocándose en la estufa durante 24 hrs, a 100°C. La muestra se enfrió en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesó (3).

Cálculos:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{pérdida de peso en g}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

2.8.4. Proteína (Método de Microkjeldahl)

El principio de este método consiste en que, al ser oxidadas las proteínas y demás materias orgánicas por el ácido sulfúrico, el nitrógeno presente

se convierte en sulfato de amonio. Al hacer reaccionar a esta solución con una base fuerte, se desprende amoníaco, el cual se destila y recibe en un volumen conocido de ácido bórico. Por titulación del ácido no neutralizado, se calcula la cantidad de amoníaco desprendido y así, la cantidad de nitrógeno de la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 da el porcentaje de proteína (5).

Para la determinación de proteína se pesó 0.2 g de muestra seca en papel glassine y se colocaron en un matraz de microkjeldahl de 30 ml. Se añadieron 2 ml de mezcla digestora (300 ml de ácido sulfúrico, 100 ml de ácido fosfórico, 3 g de sulfato de cobre y 3 g de dióxido de selenio). Se calentó la mezcla en reacción hasta una total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz estuvo completamente claro, sin residuo alguno. Una vez enfriado el matraz de digestión, el residuo fue disuelto en la menor cantidad posible de agua destilada (5 ml) y transferido al aparato de destilación. A la salida del condensador del destilador se le colocó un vaso de precipitados de 100 ml con 15 ml de ácido bórico al 4% y 2 gotas de indicador. Este indicador se preparó mezclando dos partes de una solución de rojo de metilo al 0.2% con una parte de solución alcohólica de azul de metileno al 0.2%.

Al iniciarse la ebullición en el aparato de destilación, se añadieron lentamente 20 ml de hidróxido de sodio 1:1, empezando entonces la destilación hasta obtener 50 ml de destilado. Se retiró el vaso del aparato, se tituló con ácido clorhídrico 0.01N hasta la aparición de color rosa claro, uti

lizando fenolftaleína como colorante. Se determinó un blanco con un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra.

Cálculos:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{(\text{ml HCl problema} - \text{ml HCl blanco}) \times \text{N HCl} \times 0.014 \times 100}{\text{g muestra}}$$

$$\text{Proteína (\%)} = \text{nitrógeno (\%)} \times 6.25$$

2.8.5. Cenizas

En un crisol a peso constante (a 600°C durante una hora), se coloca una cantidad exacta de muestra (0.5 g) y se quema lentamente el material sobre una parrilla hasta no haber desprendimiento de humos, sometiéndose el crisol con la muestra a calcinación en una mufla a una temperatura de 600°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se transfiere a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente se pesa el crisol (6).

Cálculos:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(P - p) \times 100}{\text{g muestra}}$$

Donde:

P = peso del crisol con las cenizas

p = peso del crisol vacío

2.9. Método matemático de diseño experimental de Box-Wilson

En el primer grupo de experimentos (I y II) se aplicó una simplificación del método matemático de Box-Wilson para el diseño de experimentos.

Esta técnica permite optimizar un proceso más rápidamente y con menor número de experimentos. Además, se varían los factores estudiados simultáneamente, considerando las posibles interacciones de sinergismos y antagonismos entre dichos factores (28).

Consiste en identificar el proceso con una ecuación lineal del siguiente tipo:

$$R = F_0 + b_1(A) + b_2(B) + b_3(C) + \dots + b_i(I)$$

Donde:

R = dato de la medida

F_0 = efecto residual de los otros parámetros (\bar{X})

$b_1 \dots b_i$ = coeficientes algebraicos de importancia de cada factor estudiado

A, B, . . . I = factores cualitativos (+ ó -) fijados a un nivel definido

Para calcular los coeficientes de la ecuación matemática con n variables, se necesitan n + 1 experiencias diferentes, en las cuales todos los factores deben variar. Para resolver este problema se utilizó el método matri-

cial, para calcular los coeficientes, así como para definir las condiciones de cada experiencia, elaborando una matriz de 7x7, para el experimento I, y de 4x4, para el II, ambas con diagonal negativa y adición de una línea positiva.

Se fijaron niveles de amplitudes de variaciones utilizando los datos de la literatura (Tablas 3.1. y 3.7.) (Ver capítulo III).

A continuación se presentan las matrices utilizadas para estos experimentos:

Matriz de 7x7:

A	B	C	D	E	F	G
-	+	-	+	-	+	-
-	-	+	-	+	-	+
+	-	-	+	-	+	-
-	+	-	-	+	-	+
+	-	+	-	-	+	-
-	+	-	+	-	-	+
+	-	+	-	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+

Matriz de 4x4:

A	B	C	D
-	+	-	+
-	-	+	-
+	-	-	+
-	+	-	-
+	+	+	+

TABLA 2.1

PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL PCZOL, APLICANDO EL METODO DE DISENO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON. EXPERIMENTO I

Medio.	Almidón (g)	Caseína (g)	Ca(OH) ₂ (g)	CaCO ₃ (g)	NaCl (g)	Vitaminas (g)	Cocao (g)	Aceite de maíz (g)	pH
1	1.2	0.1092	- - -	0.198	- -	0.004	- -	0.036	6.5
2	1.2	0.1092	0.148	- - -	0.6	- - -	0.24	0.096	sin control
3	1.2	0.1746	0.148	- - -	- -	0.004	- -	0.036	6.5
4	1.2	0.1092	- - -	0.198	- -	- - -	0.24	0.096	sin control
5	1.2	0.1746	0.148	- - -	0.6	- - -	- -	0.036	6.5
6	1.2	0.1092	- - -	0.198	- -	0.004	- -	0.096	sin control
7	1.2	0.1746	0.148	- - -	0.6	- - -	0.24	0.036	sin control
8	1.2	0.1746	- - -	0.198	0.6	0.004	0.24	0.096	6.5

Para cada medio se tenían 9 tubos, a los que se le agregaban 20 ml de agua destilada y se tapaban con hule espuma

Todos los medios fueron inoculados con microflora mixta de pozol y *Agrobacterium azotophilum*

TABLA 2.2

PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL, APLICANDO EL METODO DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON. EXPERIMENTO II

Medio	Harina (g)	Minsa (g)	Almidón (g)	Casefna (g)	Cocoa (g)	Aceite de maíz (g)	pH
1	1.2		0.96	- -	0.24	0.096	sin control
2	1.2		0.96	- -	- -	0.036	6.5
3	1.2		- -	0.15	- -	0.096	sin control
4	1.2		0.96	- -	0.24	0.036	sin control
5	1.2		- -	0.15	0.24	0.096	6.5
Control	1.2		- -	- -	- -	- - -	sin control

Para cada medio se tenían 9 tubos, a los que se le agregaban 20 ml de agua destilada y se tapaban con hule espuma

Todos los medios fueron inoculados con microflora mixta de pozol y *Agrobacterium azotophilum*

TABLA 2.3

PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA INDIVIDUAL DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL POZOL EN HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO. EXPERIMENTO III

Medio	Fuente de nitrógeno (g)	Almidón (g)	Aceite de maíz (g)	Manteca de cacao (g)
1	- - -	- - -	- -	- -
2	- - -	- - -	0.10	- -
3	Caseína 0.150	- - -	- -	0.1
	+ Cocoa 0.240			
4.1	Caseína 0.150	- - -	- -	- -
4.2	Caseína 0.150	- - -	0.10	- -
4.3	Caseína 0.150	- - -	0.15	- -
4.4	Caseína 0.150	- - -	0.20	- -
5	Caseína 0.150	- - -	- -	0.1
6	Caseína 0.096	- - -	0.10	- -
7.1	Peptona de soya 0.436	- - -	0.10	- -
7.2	Gallinaza 1.020	- - -	0.10	- -
7.3	Sulfato de amonio 0.193	- - -	0.10	- -
7.4	Urea 0.088	- - -	0.10	- -
8	- - -	0.464	0.10	- -

Como fuente de carbono primaria se utilizó 1.2 g de harina de maíz nixtamalizado

Para cada medio se tenían 6 tubos, a los que se le agregaban 20 ml de agua destilada y se tapaban con hule espuma

Todos los medios fueron inoculados con microflora mixta de pozol y *Agrobacterium azotophilum*

TABLA 2.4

PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL EN SUSTRATOS DE DIFERENTES FUENTES DE MAIZ NIXTAMALIZADO, EXPERIMENTO IV

Medio	Harina de maíz nixt. (g)	Maíz V-524 nixt. (g)	Maíz criollo "Tuxpeñito" nixt. (g)	Fuente de nitrógeno	(g)	Tipo de medio de fermentación
1.1	1.2000	- -	- -	Casefna	0.1257	S.d.
1.2	1.2000	- -	- -	Cocoa	1.0854	S.d.
1.3	1.2000	- -	- -	Harina de soya	0.2712	S.d.
1.4	1.2000	- -	- -	Peptona de soya	0.2119	S.d.
1.5	1.2000	- -	- -	Sulfato de amonio	0.0759	S.d.
1.6	1.2000	- -	- -	Urea	0.0301	S.d.
2.1	1.2000	- -	- -	Casefna	0.0382	S.d.
2.2	1.2000	- -	- -	Casefna	0.0800	S.d.
2.3	1.2000	- -	- -	Casefna	0.1543	S.d.
3*	1.2000	- -	- -	Casefna	0.1257	S.d.
4.1	- - -	1.20	- -	- - -	- - -	S.d.
4.2	- - -	- -	1.2	- - -	- - -	S.d.
5.1	32.5869	- -	- -	Casefna	3.4131	S.c.
5.2	- - -	36.00	- -	- - -	- - -	S.c.
5.3	- - -	- -	36.0	- - -	- - -	S.c.
6.1	54.3114	- -	- -	Casefna	5.6886	M.e.
6.2	- - -	60.00	- -	- - -	- - -	M.e.
6.3	- - -	- -	60.0	- - -	- - -	M.e.

Se tenían 6 muestras para cada medio

Todos los medios fueron inoculados con microflora mixta de pozol y *Agrobacterium azotophilum*

* Todos los medios fueron cubiertos con película plástica impermeable a gases, excepto el 3, que fue cubierto con hule espuma

S.d. = Solución diluida

S.c. = Solución concentrada

M.e. = Masa en forma esférica

TABLA 2.5

PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS AMILACEOS. EXPERIMENTO Y

Medio	Fuente de carbono primaria (g)	Fuente de carbono secundaria (g)	Fuente de nitrógeno (g)	Tipo de medio de fermentación	Mixtamalización 1 cocción 1 remojo (min.) (hrs.)	Inóculo	
1.1	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	AP
1.2*	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	AP
1.3	Harina	1.200	---	Caseína	0.2265	S.d.	AP
2.1	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Caseína	0.1022	S.d.	AP
2.2	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Caseína	0.1134	S.d.	AP
2.3	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Caseína	0.1246	S.d.	AP
2.4	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Caseína	0.1134	S.d.	AP
2.5	Mafz TC 85 AR	150.000	---	Caseína	12.7700	M.e.	AP
2.6	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Caseína	0.0454	S.d.	AP
3.1	Mafz TC 85 AR	150.000	---	Urea	3.0600	M.e.	AP
3.2	Mafz TC 85 AR	135.000	Yoghurt	Caseína	13.6100	M.e.	AP
3.3	Mafz TC 85 FR	150.000	---	Caseína	12.7700	M.e.	AP
3.4	Mafz TC 85 AR	1.200	---	Urea	0.0245	S.d.	AP
4.1	Harina	0.800	Plátano	Caseína	0.1392	S.d.	AP
4.2	Harina	0.800	Plátano	Urea	0.0334	S.d.	AP
4.3	Plátano	0.800	Harina	Caseína	0.1526	S.d.	AP
4.4	Plátano	0.800	Harina	Urea	0.0336	S.d.	AP
4.5	Plátano	1.200	---	Caseína	0.1661	S.d.	AP
5.1	Harina	0.800	Col	Caseína	0.0963	S.d.	AP
5.2	Harina	0.800	Col	Urea	0.0231	S.d.	AP
5.3	Col	0.800	Harina	Caseína	0.0668	S.d.	AP
5.4	Col	0.800	Harina	Urea	0.0160	S.d.	AP
5.5	Col	1.200	---	Caseína	0.0373	S.d.	AP
6.1	Harina	1.200	---	Urea	0.0354	S.d.	AP
6.2	Harina	1.200	---	Urea	0.0428	S.d.	AP
7.1	Sorgo	2.750	---	Caseína	0.1282	S.d.	AP
7.2**	Sorgo	2.930	---	Caseína	0.0732	S.d.	AP
7.3	Sorgo	2.750	---	Caseína	0.0300	S.d.	AP
7.4	Sorgo	2.750	---	Caseína	0.1905	S.d.	AP
8.0	Sorgo	2.750	---	Urea	0.0307	S.d.	AP
9.0	Sorgo	3.110	---	Caseína	0.0747	S.d.	AP
10.1	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	A
10.2	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	P
10.3	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	---
11.1***	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	AP
11.2***	Harina	1.200	---	Caseína	0.1257	S.d.	AP
12.1	Almidón	0.956	Glúten	Caseína	0.1180	S.d.	AP
12.2	Almidón	1.200	---	Caseína	0.2542	S.d.	AP

Se tenían 6 muestras para cada medio

* Todos los medios se empaquetaron con película plástica impermeable a nases, excepto el 1.2

** El sorgo utilizado fue de bajo contenido de taninos, excepto el del medio 7.2, que fue de alto contenido de taninos

*** Todos los medios se incubaron a 28°C, excepto el 11.1, que se incubó a 35°C y el 11.2, a 45°C

S.d. = Solución diluida; M.e. = Masa en forma esférica

A = *Agrobacterium azotophilum*; P = microflora mixta de pozol

La harina utilizada fue de mafz mixtamalizado industrializado

CAPITULO III

RESULTADOS

III. RESULTADOS

3.1. Estudio de la fermentación del pozol, aplicando el método de diseño experimental de Box-Wilson

Para realizar la caracterización de la fermentación del pozol de una manera más rápida, se decidió utilizar inicialmente el método de diseño experimental de Box-Wilson (Ver Materiales y Métodos). Para lo cual se debe partir de las variables de las que puede esperarse una mayor influencia. De acuerdo a estudios existentes realizados sobre diversos tipos de fermentaciones lácticas, se seleccionaron los siguientes parámetros para ser evaluados en estos primeros experimentos: el pH (12), la relación C/N (21,49), la adición de vitaminas (11) y de NaCl (26).

Dado que la fijación de nitrógeno únicamente se ha reportado en medios de maíz nixtamalizado y no en los productos fermentados de maíz cocido africano y otras fermentaciones lácticas de cereales (1, 22, 2, 47), se consideró también adecuado evaluar el efecto de los componentes característicos del maíz nixtamalizado. Por ello, se consideró conveniente suplementar el almidón de maíz con dos tipos de sales de calcio como sustitución de dicho proceso. Ya que en experimentos previos se observó que los pozoles suplementados con cacao regularmente tienen un contenido mayor de proteína (19), se evaluó también el efecto de la adición de cacao.

El diseño experimental consistió en preparar un sustrato similar al maíz

nixtamalizado, mezclando los componentes que éste tiene: almidón, fuente de nitrógeno, calcio, aceite y vitaminas. Al mismo tiempo, se realizó la fermentación con harina de maíz nixtamalizado como elemento principal, variando los parámetros que supuestamente ejercen mayor influencia: la relación C/N, el valor de pH al inicio y su control durante la fermentación, la adición de cocoa y de aceite de maíz. La evolución de la fermentación fue seguida midiendo los cambios en el contenido de proteína, acidez titulable, humedad y valor del pH.

El método experimental de Box-Wilson requiere que se considere para cada variable un nivel inferior y otro superior. Los niveles correspondientes que fueron seleccionados para el experimento con un sustrato similar al maíz se indican en la Tabla 3.1. De acuerdo a ello, se elaboró el diseño experimental indicado en la Tabla 3.2. Los cambios en el contenido de proteína, acidez titulable, humedad y del valor del pH que se observaron en este primer experimento se indican en las Tablas 3.3 y 3.4. A partir de estos datos se calcularon los coeficientes correspondientes a cada variable, los cuales son reportados en la Tabla 3.5. Las ecuaciones lineales obtenidas para este primer experimento se reportan en la Tabla 3.6. Así, los resultados obtenidos con el sustrato similar al maíz indican que una relación C/N de 25 presenta una influencia positiva sobre todos los parámetros de la fermentación. El coeficiente de la cocoa resultó también positivo, por lo que ésta debe ser agregada en un 1.2%. Por otro lado, el coeficiente negativo de las vitaminas indica que éstas no deben ser agregadas.

TABLA 3.1

VALOR DEL NIVEL SUPERIOR E INFERIOR DADO PARA LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTUDIADOS EN LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ

Parámetros	Nivel Superior (+)	Nivel Inferior (-)
C/N	25	40
Ca ⁺⁺	CaCO ₃	Ca(OH) ₂
NaCl	3	0
Vitaminas	0.02%	0
Cocoa	1.2%	0
pH	6.5	sin control
Aceite de maíz	0.48%	0.18%

TABLA 3.2

CONDICIONES DE LOS DIFERENTES PARAMETROS PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ

Medio	PARAMETROS						
	Relación C/N	Fuente de calcio	NaCl (%)	Vit. (%)	Cocoa (%)	pH	Aceite de maíz (%)
1	40	CaCO ₃	0	0.02	0.0	6.5	0.18
2	40	Ca(OH) ₂	3	0.00	1.2	s/c	0.48
3	25	Ca(OH) ₂	0	0.02	0.0	6.5	0.18
4	40	CaCO ₃	0	0.00	1.2	s/c	0.48
5	25	Ca(OH) ₂	3	0.00	0.0	6.5	0.18
6	40	CaCO ₃	0	0.02	0.0	s/c	0.48
7	25	Ca(OH) ₂	3	0.00	1.2	s/c	0.18
8	25	CaCO ₃	3	0.02	1.2	6.5	0.48

s/c = sin control

TABLA 3.3

EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE ACIDEZ TITULABLE Y DE PROTEINA EN LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ, APLICANDO EL METODO DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON

Medio	Contenido de proteína (%)			Acidez titulable (%)		
	inicial	a los 7 días	a los 14 días	inicial	a los 7 días	a los 14 días
1	6.27 ± 0.25	2.63 ± 0.00	1.60 ± 1.34	0.23 ± 0	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.00
2	5.69 ± 0.76	5.54 ± 0.51	3.50 ± 0.88	0.09 ± 0	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.03
3	8.46 ± 0.77	7.15 ± 0.51	5.98 ± 0.25	0.05 ± 0	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03
4	7.00 ± 0.75	2.63 ± 0.00	7.87 ± 3.06	0.05 ± 0	0.15 ± 0.11	0.28 ± 0.32
5	6.85 ± 0.10	3.21 ± 1.54	4.81 ± 1.58	0.09 ± 0	0.05 ± 0.00	0.08 ± 0.03
6	6.42 ± 0.25	2.92 ± 1.66	3.94 ± 1.16	0.23 ± 0	0.11 ± 0.03	0.23 ± 0.14
7	7.44 ± 0.00	6.56 ± 0.44	6.10 ± 1.20	0.09 ± 0	0.22 ± 0.18	0.22 ± 0.18
8	8.17 ± 0.25	7.58 ± 1.01	8.02 ± 0.91	0.09 ± 0	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.00

TABLA 3.4

EVOLUCION DEL pH Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ, APLICANDO EL METODO DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON

Medio	pH			Humedad (%)		
	inicial	a los 7 días	a los 14 días	inicial	a los 7 días	a los 14 días
1	6.50 ± 0.00	6.80 ± 0.35	7.06 ± 0.12	94.49 ± 0.51	94.73 ± 1.18	95.82 ± 0.29
2	6.70 ± 0.00	6.76 ± 0.21	6.46 ± 0.55	90.56 ± 1.35	89.90 ± 0.57	90.03 ± 1.55
3	6.50 ± 0.00	6.33 ± 0.06	6.46 ± 0.25	94.27 ± 0.24	95.38 ± 0.61	95.24 ± 0.87
4	6.46 ± 0.15	6.46 ± 0.40	6.03 ± 0.55	93.26 ± 1.10	93.20 ± 0.32	93.59 ± 0.65
5	6.50 ± 0.00	6.63 ± 0.29	6.13 ± 0.25	90.72 ± 3.26	92.81 ± 1.36	91.82 ± 0.15
6	6.43 ± 0.06	6.96 ± 0.25	7.00 ± 0.20	94.43 ± 0.68	93.27 ± 0.43	93.71 ± 0.70
7	7.06 ± 0.06	7.23 ± 0.38	7.13 ± 0.42	90.86 ± 0.86	89.82 ± 0.24	88.97 ± 0.56
8	6.50 ± 0.00	6.83 ± 0.45	6.10 ± 0.20	90.45 ± 0.67	91.82 ± 2.35	95.02 ± 1.17

TABLA 3.5

COEFICIENTES DE LOS PARAMETROS DE LAS ECUACIONES LINEALES DE LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ

Determinaciones	pH		Acidez titulable (%)		Contenido de protefna (%)	
	a los 7 días	a los 14 días	a los 7 días	a los 14 días	a los 7 días	a los 14 días
C/N	0.053	0.133	0.052	0.015	0.556	0.306
Ca	-0.121	-0.093	-0.048	-0.008	-0.766	0.204
NaCl	-0.003	0.233	0.040	0.000	0.948	0.380
Vitaminas	-0.078	-0.233	-0.036	-0.058	0.000	-0.635
Cocoa	0.028	0.231	0.044	0.062	0.766	1.109
pH	0.021	0.011	0.017	-0.062	-0.036	-0.525
Aceite de maíz	-0.061	0.105	-0.017	0.031	0.109	0.024

TABLA 3.6

ECUACIONES LINEALES, OBTENIDAS POR EL METODO DE BOX-WILSON, DE LA FERMENTACION DE UN SUSTRATO SIMILAR AL MAIZ

Determinaciones analíticas	Tiempo de fermentación (días)	Ecuaciones lineales
pH	7	$R = 0.168 + 0.053(C/N) - 0.121(Ca^{++}) - 0.003(NaCl) - 0.076(V) + 0.028(C) + 0.021(pH) - 0.061(A)$
	14	$R = 0.001 + 0.133(C/N) - 0.093(Ca^{++}) + 0.233(NaCl) - 0.233(V) + 0.231(C) + 0.011(pH) + 0.106(A)$
Acidez titulable (%)	7	$R = -0.033 + 0.052(C/N) - 0.048(Ca^{++}) + 0.04(NaCl) - 0.036(V) + 0.044(C) + 0.017(pH) - 0.017(A)$
	14	$R = 0.019 + 0.015(C/N) - 0.008(Ca^{++}) + 0(NaCl) - 0.058(V) + 0.062(C) - 0.062(pH) + 0.031(A)$
Proteína (%)	7	$R = -2.26 + 0.656(C/N) - 0.766(Ca^{++}) + 0.948(NaCl) + 0(V) + 0.766(C) - 0.035(pH) + 0.109(A)$
	14	$P = -1.808 + 0.306(C/N) + 0.204(Ca^{++}) + 0.380(NaCl) - 0.635(V) + 1.109(C) - 0.525(pH) + 0.824(A)$

V = vitaminas; C = cocoa; A = aceite de maíz

Respecto a la evolución del pH, a la semana de fermentación, el coeficiente negativo de la fuente de calcio indica que ésta debe adicionarse en forma de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, el del NaCl , que no debe agregarse y el del aceite de maíz, que es conveniente agregar solo un 0.18%, mientras que el coeficiente positivo del pH indica que éste debe ser controlado a 6.5. El factor que presentó mayor influencia fue la fuente de calcio. A las dos semanas de fermentación los coeficientes indican la conveniencia de emplear $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como fuente de calcio, mientras que resultó más conveniente la adición de mayores cantidades de NaCl (3%) y de aceite de maíz (0.48%), así como el control del pH a un valor de 6.5. Para este tiempo de fermentación los factores que ejercieron mayor influencia fueron el NaCl , las vitaminas y la cocoa.

En relación a la acidez titulable, a la semana de fermentación el coeficiente negativo de la fuente de calcio indica que ésta debe ser adicionada en forma de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, mientras que el del aceite de maíz, que sólo se debe agregar un 0.18%. Los coeficientes positivos del NaCl y del pH indican que se debe agregar un 3% del primero y el segundo debe ser controlado a un valor de 6.5. El factor más influyente sobre la evolución de la acidez titulable a la semana de fermentación fue la relación C/N, pero a las dos semanas fueron la adición de cocoa y el control del pH. A este tiempo los coeficientes indican que el ión Ca^{++} debe adicionarse en forma de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, el pH no debe ser controlado y el aceite de maíz debe agregarse en un 0.48%. En este caso, el NaCl no presentó influencia alguna.

Con respecto a la evolución del contenido de proteína, a la semana de fermentación el factor más influyente fue el NaCl, cuya influencia es positiva, por lo que debe ser adicionada. Los coeficientes negativos de la fuente de calcio y del pH indican que el primero debe ser agregado en forma de Ca(OH)_2 , mientras que el segundo no debe ser controlado y el coeficiente positivo del aceite de maíz indica que se debe agregar en un 0.48%. A las dos semanas de fermentación los resultados fueron los mismos que a la semana, excepto en que el coeficiente de la fuente de calcio es positivo, por lo que debe ser agregado en forma de CaCO_3 y el factor más importante fue la adición de cocoa. En este caso el coeficiente de las vitaminas fue negativo, lo que indica que no conviene adicionarlas.

Los experimentos efectuados con el sustrato de harina de maíz nixtamalizado fueron diseñados de la misma forma que como se describió para el sustrato similar al maíz. En la Tabla 3.7 se indican los valores de los niveles inferiores y superiores para cada uno de los parámetros experimentados y en la Tabla 3.8 se describen los diferentes tratamientos ensayados. Los resultados obtenidos en estos experimentos se indican en las Tablas 3.9 y 3.10. Los coeficientes correspondientes a cada variable, calculados a partir de estos datos, se reportan en la Tabla 3.11 y las ecuaciones lineales obtenidas, en la Tabla 3.12. El ajuste continuo del pH a 6.5 presentó una influencia negativa sobre todos los parámetros de la fermentación, lo que indica que no debe ser controlado.

Con respecto a la evolución del pH a la semana de fermentación, el coefi-

TABLA 3.7

VALOR DEL NIVEL SUPERIOR E INFERIOR DADO PARA LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTUDIADOS EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Parámetros	Nivel Superior (+)	Nivel Inferior (-)
C/N	13.25	65.1
Cocoa	1.2%	0
pH	6.5	sin control
Aceite de maíz	0.48%	0.18%

TABLA 3.8

CONDICIONES DE LOS DIFERENTES PARAMETROS PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Medio	PARAMETROS			
	Relación C/N	Cocoa (%)	pH	Aceite de maíz (%)
1	65.10	1.2	s/c	0.48
2	65.10	0.0	6.5	0.18
3	13.25	0.0	s/c	0.48
4	65.10	1.2	s/c	0.18
5	13.25	1.2	6.5	0.48
Control	32.00	0.00	s/C	0.00

s/c = sin control

TABLA 3.9

EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE ACIDEZ TITULABLE Y DE PROTEINA EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON

Medio	Contenido de proteína (%)			Acidez titulable (%)		
	inicial	a los 7 días	a los 14 días	inicial	a los 7 días	a los 14 días
1	4.59 ± 0.05	4.81 ± 0.00	7.22 ± 0.05	0.05 ± 0	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00
2	4.59 ± 0.43	3.94 ± 0.00	5.91 ± 0.05	0.05 ± 0	0.14 ± 0.00	0.06 ± 0.00
3	13.13 ± 0.00	17.28 ± 0.43	20.34 ± 0.43	0.05 ± 0	0.48 ± 0.03	1.10 ± 0.05
4	5.03 ± 0.43	6.34 ± 0.05	7.87 ± 0.19	0.05 ± 0	0.98 ± 0.08	0.79 ± 0.00
5	18.81 ± 0.00	17.72 ± 0.05	20.56 ± 0.19	0.09 ± 0	0.19 ± 0.00	0.09 ± 0.00
Control	8.09 ± 0.05	9.84 ± 0.43	13.56 ± 0.19	0.08 ± 0	0.32 ± 0.02	0.43 ± 0.03

TABLA 3.10

EVOLUCION DEL pH Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTA MALIZADO, DE ACUERDO AL METODO DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-WILSON

Medio	pH			Humedad (%)		
	inicial	a los 7 días	a los 14 días	inicial	a los 7 días	a los 14 días
1	6.20 ± 0.17	5.06 ± 0.12	4.26 ± 0.38	90.28 ± 2.64	91.01 ± 1.38	90.93 ± 0.59
2	6.50 ± 0.00	5.80 ± 0.35	6.46 ± 0.47	93.21 ± 0.69	94.12 ± 0.67	94.20 ± 0.27
3	6.06 ± 0.21	4.36 ± 0.12	3.95 ± 0.06	96.46 ± 0.31	95.38 ± 0.52	95.34 ± 0.93
4	6.60 ± 0.10	4.53 ± 0.05	4.16 ± 0.06	91.73 ± 1.30	91.21 ± 0.16	90.55 ± 0.47
5	6.50 ± 0.00	6.56 ± 0.12	6.60 ± 0.35	94.54 ± 0.70	95.05 ± 0.38	96.50 ± 0.40
Control	6.76 ± 0.15	4.53 ± 0.15	4.36 ± 0.12	96.73 ± 0.93	96.21 ± 0.23	96.63 ± 0.34

TABLA 3,11

COEFICIENTES DE LOS PARÁMETROS DE LAS ECUACIONES LINEALES DE
LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Determinaciones	pH		Acidez titulable (%)		Contenido de proteína (%)	
	7 días	14 días	7 días	14 días	7 días	14 días
C/N	-0.545	-0.484	-0.080	-0.056	0.437	0.438
Cocoa	0.150	0.428	0.080	0.049	-0.733	-0.262
pH	-0.854	-1.308	-0.216	-0.469	-1.488	-1.925
Aceite de maíz	-0.018	0.292	-0.080	0.173	0.525	1.488

coeficiente negativo de la relación C/N indica que debe ser de 65,1, el del aceite, que sólo se debe adicionar un 0,18%, mientras que el positivo de la cocoa indica que hay que adicionar un 1,2%. El factor más influyente fue el ajuste continuo del pH a un valor de 6,5. A las dos semanas de fermentación los resultados fueron similares, excepto en que el coeficiente del aceite fue positivo por lo que se debe adicionar en un 0,48%.

En relación a la acidez titulable a la semana de fermentación, el factor más influyente fue también el pH, el coeficiente de la relación C/N y del aceite de maíz fueron negativos, indicando que el primero debe ser de 65,1 y el segundo se debe agregar en un 0,18%, mientras que el coeficiente de la cocoa fue positivo, por lo que ésta sí debe ser agregada. A las dos semanas de fermentación los resultados fueron iguales, excepto en que el coeficiente del aceite fue positivo, por lo que se debe agregar en un 0,48%.

Con respecto a la evolución del contenido de proteína, tanto a la semana de fermentación como a las dos semanas, el coeficiente de la relación C/N y del aceite de maíz fueron positivos, indicando que la relación C/N debe ser de 13,25 y se debe agregar aceite de maíz en un 0,48%. Los coeficientes de la cocoa y del pH fueron negativos, por lo que no se debe agregar cocoa ni controlar el pH, siendo este último el factor más influyente.

Considerando los valores máximos de contenido de proteína alcanzados con la fermentación, ningún tratamiento del primer grupo de experimentos alcan

TABLA 3.12

ECUACIONES LINEALES, OBTENIDAS POR EL METODO DE BOX-WILSON, DE LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Determinaciones analíticas	Tiempo de fermentación (días)	Ecuaciones lineales
pH	7	$R = 1.11 - 0.545(C/N) + 0.15(C) - 0.854(pH) - 0.018(A)$
	14	$R = 1.284 - 0.484(C/N) + 0.428(C) - 1.308(pH) + 0.292(A)$
Acidez titulable (%)	7	$R = 0.290 - 0.08(C/N) + 0.08(C) - 0.216(pH) - 0.08(A)$
	14	$R = 0.475 - 0.056(C/N) + 0.049(C) - 0.469(pH) + 0.173(A)$
Proteína (%)	7	$R = 0.788 + 0.437(C/N) - 0.733(C) - 1.488(pH) + 0.525(A)$
	14	$R = 3.150 + 0.438(C/N) - 0.262(C) - 1.925(pH) + 1.488(A)$

C = cocoa; A = aceite de maíz

zó el valor de proteína final al que llegó el control de harina de maíz nixtamalizado, que fue de 14.73%. En el segundo grupo de experimentos sólo el medio 3 alcanzó un incremento de proteína mayor que el control.

En términos generales, fue posible observar que la fermentación del sustrato similar al maíz no resultó ser de tipo láctico, ya que el pH no disminuyó significativamente y, por otro lado, la acidez titulable y el contenido de proteína, disminuyeron en casi todos los medios. Con el sustrato de harina de maíz nixtamalizado, la fermentación que se desarrolló fue aparentemente de tipo láctico. En este caso, fue posible observar claramente que no es conveniente controlar el pH durante la fermentación. Los resultados obtenidos con las otras variables (relación C/N, adición de co-coa y de aceite de maíz) fueron contradictorios. En consecuencia, el uso del método de Box-Wilson para estudiar esta fermentación no permitió hacer una distinción clara de los efectos de cada una de las variables estudiadas. Por ello, se decidió estudiar este proyecto, evaluando los efectos de cada variable por separado.

3.2. Influencia individual de los parámetros en la fermentación del pozol en harina de maíz nixtamalizado

En vista de los resultados obtenidos previamente, se continuó este estudio únicamente empleando el sustrato de harina de maíz nixtamalizado, evaluando los efectos que mostraron cierta influencia en los experimentos anteriores, como el contenido inicial de nitrógeno y la adición de aceite de maíz y de cocoa. Se decidió también estudiar la fuente de nitrógeno, debido a que a pesar de la escasa necesidad de sustancias nitrogenadas completas que presenta el *Agrobacterium azotophilum*, esta bacteria se desarrolla vigorosamente en medios que la contienen (44). Sólo se evaluó la fermentación al inicio y a las dos semanas, ya que previamente se observó que a la semana la fermentación no es óptima.

Se siguió el diseño experimental indicado en la Tabla 3.13, utilizándose dos tipos de fuente de nitrógeno: protéica e inorgánica. Los niveles de contenido inicial de proteína se eligieron basándose en el contenido de proteína de la harina de maíz nixtamalizado industrializada (7-8%), y en el de las muestras de los experimentos anteriores que tenían una relación C/N de 13.25 (16.27%), estudiando además niveles cercanos a éstos. Se suplementó con aceite de maíz o de cacao para corroborar la existencia de alguna influencia, debido a los resultados contradictorios anteriormente obtenidos.

TABLA 3.13

DISERIO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA INDIVIDUAL
DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL POZOL

Medio	Parámetros			
	Fuente de carbono secundaria	Fuente de nitrógeno	Contenido inicial de proteína (%)	Contenido de aceite* (%)
1	- - -	- - -	7-8	0.00
2	- - -	- - -	7-8	0.50
3	cocoa	caseína	15-17	0.50 (de cacao)
4.1	- - -	caseína	15-17	0.00
4.2	- - -	caseína	15-17	0.50
4.3	- - -	caseína	15-17	0.75
4.4	- - -	caseína	15-17	1.00
5	- - -	caseína	15-17	0.50 (de cacao)
6	- - -	caseína	12-13	0.50
7.1	- - -	peptona de soya	20	0.50
7.2	- - -	gallinaza	14	0.50
7.3	- - -	sulfato de amonio	23	0.50
7.4	- - -	urea	26	0.50
8	almidón	- - -	5	0.50

* A menos que se mencione lo contrario, el aceite es de maíz

En todos los experimentos se utilizó como fuente de carbono primaria harina de maíz nixtamalizado

En las Tablas 3.14 y 3.15 se presentan los resultados obtenidos, evaluando se los cambios en el contenido de humedad, acidez titulable, contenido de proteína y en los valores de pH.

3.2.1. Influencia del contenido inicial de proteína

Se observó que a mayor contenido inicial de proteína, mayor es el incremento de ésta debido a la fermentación, llegándose a un valor máximo de 23.77% a partir de un 15.46%, mientras que cuando se suplementó con almidón sólo aumentó de 5.25 a 6.85% de proteína (Figura 3.1.). No se observó relación alguna entre el contenido de proteína inicial y el aumento de humedad y acidez titulable y disminución del pH.

3.2.2. Influencia de la fuente de nitrógeno

El mayor incremento en el contenido de proteína lo presentaron las muestras suplementadas con caseína (de 15.46 a 23.77%) (Figura 3.2), mientras que con urea hubo una disminución (de 26.10 a 23.48%). Con gallinaza y con peptona de soya hubo incremento de proteína (de 14 a 17.06% y de 20.4 a 24.21%, respectivamente), aunque con caseína éste fue mayor. Con sulfato de amonio el aumento fue muy pequeño (de 23.19 a 24.21%). Tampoco en este caso se observó relación alguna entre la fuente de nitrógeno, el aumento en el contenido de humedad y de acidez titulable y la disminución del pH. El único efecto notable fue que con urea esta disminución resultó ser mucho menor (de 6.46 a 5.63) que con las otras fuentes.

TABLA 3.14

EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE PROTEINA Y DE ACIDEZ TITULABLE EN EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA INDIVIDUAL DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL POZOL

Medio	Contenido de proteína (%)		Acidez titulable (%)	
	inicial	a los 14 días	inicial	a los 14 días
1	7.73 ± 0.55	11.81 ± 0.71	0.02 ± 0.00	0.56 ± 0.05
2	7.14 ± 0.74	11.67 ± 0.21	0.02 ± 0.00	0.53 ± 0.02
3	17.21 ± 0.41	23.19 ± 0.62	0.05 ± 0.00	0.56 ± 0.04
4.1	16.48 ± 0.90	26.69 ± 0.36	0.06 ± 0.00	0.31 ± 0.00
4.2	15.46 ± 1.44	23.77 ± 1.26	0.06 ± 0.00	0.49 ± 0.00
4.3	15.51 ± 0.36	22.46 ± 0.74	0.15 ± 0.01	0.48 ± 0.02
4.4	16.48 ± 0.21	23.33 ± 1.15	0.08 ± 0.00	0.42 ± 0.01
5	17.06 ± 0.62	21.00 ± 1.29	0.09 ± 0.00	0.86 ± 0.01
6	12.69 ± 0.95	19.83 ± 0.55	0.02 ± 0.00	0.71 ± 0.06
7.1	20.40 ± 1.09	24.21 ± 0.90	0.11 ± 0.01	1.13 ± 0.06
7.2	14.00 ± 1.43	17.06 ± 0.36	0.14 ± 0.00	1.61 ± 0.18
7.3	23.19 ± 0.62	24.21 ± 0.41	0.19 ± 0.00	0.48 ± 0.01
7.4	26.10 ± 1.69	23.48 ± 1.35	0.02 ± 0.00	0.60 ± 0.01
8	5.25 ± 0.36	6.85 ± 0.41	0.02 ± 0.00	0.65 ± 0.08

TABLA 3.15

EVOLUCION DEL VALOR DEL pH Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA INDIVIDUAL DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL POZOL

Medio	pH		Humedad (%)	
	inicial	a los 14 días	inicial	a los 14 días
1	6.13 ± 0.05	3.70 ± 0.14	95.55 ± 0.28	96.22 ± 0.10
2	6.16 ± 0.05	3.80 ± 0.08	93.52 ± 2.71	96.13 ± 0.74
3	5.96 ± 0.05	4.13 ± 0.05	93.80 ± 0.04	94.72 ± 0.09
4.1	5.60 ± 0.00	4.46 ± 0.40	94.95 ± 0.14	96.25 ± 0.22
4.2	5.73 ± 0.05	3.70 ± 0.16	94.12 ± 0.28	95.73 ± 1.01
4.3	5.63 ± 0.05	3.83 ± 0.05	94.20 ± 0.11	95.31 ± 0.51
4.4	5.66 ± 0.05	4.06 ± 0.33	93.62 ± 0.30	95.38 ± 0.46
5	5.70 ± 0.00	3.80 ± 0.14	94.31 ± 0.25	95.44 ± 0.39
6	5.86 ± 0.05	3.93 ± 0.34	94.28 ± 0.24	95.77 ± 0.29
7.1	6.83 ± 0.05	3.96 ± 0.05	93.20 ± 0.25	94.01 ± 0.37
7.2	6.43 ± 0.05	4.36 ± 0.17	90.54 ± 0.71	91.61 ± 0.69
7.3	6.80 ± 0.00	3.83 ± 0.05	94.14 ± 0.27	94.28 ± 0.28
7.4	6.46 ± 0.05	5.63 ± 0.47	94.96 ± 0.27	97.17 ± 0.16
8	6.10 ± 0.00	3.63 ± 0.05	93.31 ± 0.01	93.55 ± 0.20

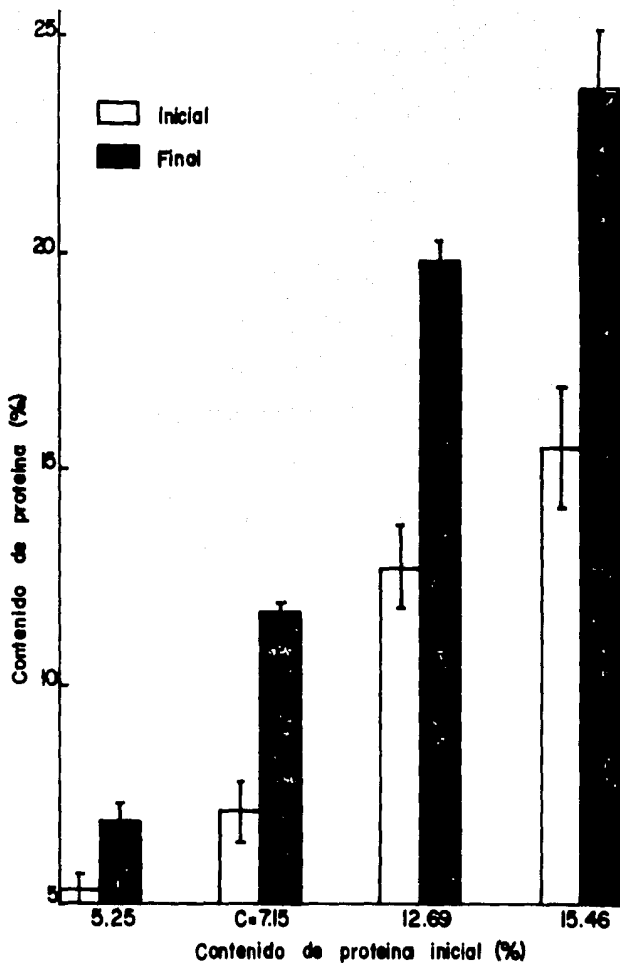


Figura 3.1. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína o almidón (0), a diferentes contenidos de proteína inicial. Con adición de 0.5% de aceite de maíz. C = control, sin suplementación.

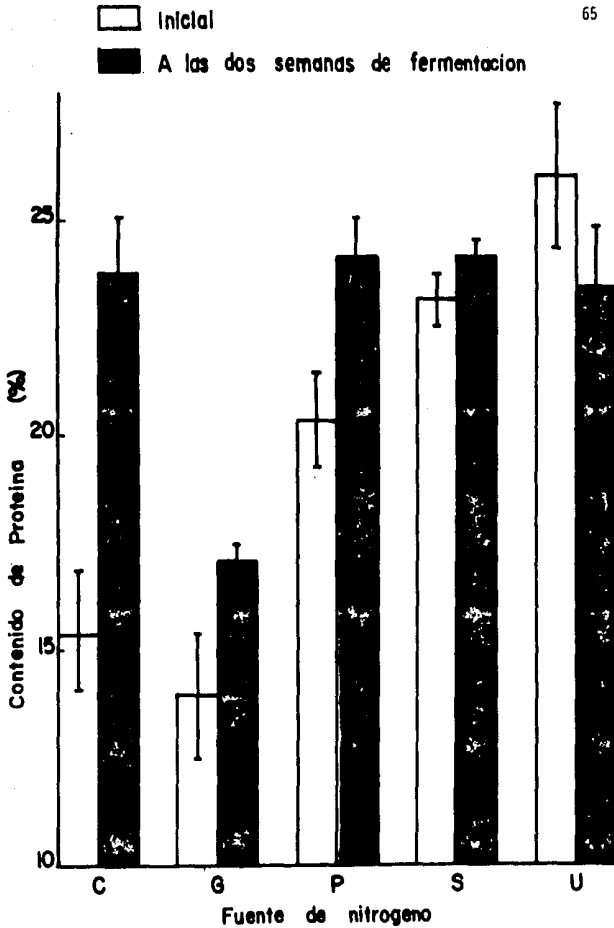


Figura 3.2. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con diferentes fuentes de nitrógeno. C = caseína; G = gallinaza; P = peptona de soya; S = sulfato de amonio; U = urea.

3.2.3. Efecto de la adición de grasa

Este efecto se evaluó en muestras sin suplementar (Figura 3.3) y en muestras suplementadas con caseína (Figura 3.4). En las primeras se adicionó 0.5% de aceite de maíz, mientras que en las muestras suplementadas se hicieron tres diferentes adiciones: 0.5, 0.75 y 1%.

En las muestras sin caseína la suplementación con aceite de maíz no alteró el aumento en el contenido de proteína, mientras que en las suplementadas hubo un ligero aumento negativo (Figuras 3.3 y 3.4). En todos los casos el pH disminuyó y la acidez titulable aumentó, pero sin observarse relación alguna con la adición de aceite de maíz.

Se observó un mayor aumento en las muestras suplementadas con aceite de maíz (de 15.46 a 23.77% de proteína) que en las suplementadas con manteca de cacao (de 17.06 a 21%) (Figura 3.5).

3.2.4. Efecto de la adición de cocoa

Hubo un ligero aumento mayor en las muestras con cocoa respecto a las muestras sin ella (de 17.21 a 23.19 y de 17.06 a 21%, respectivamente), pero éste no fue significativo (Figura 3.5). En la humedad fue ligeramente mayor en las muestras sin cocoa, el pH bajó más y hubo mayor aumento en la acidez titulable que en las muestras con cocoa.

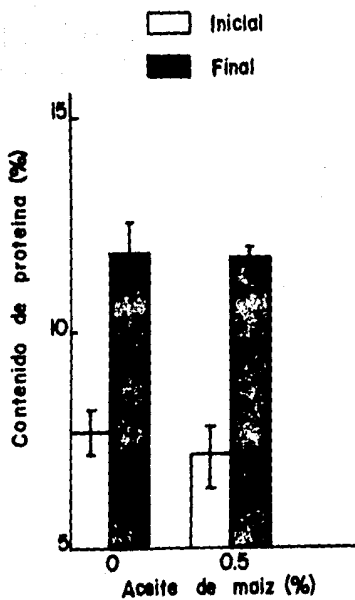


Figura 3.3. Efecto de la adición de aceite de maíz sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado.

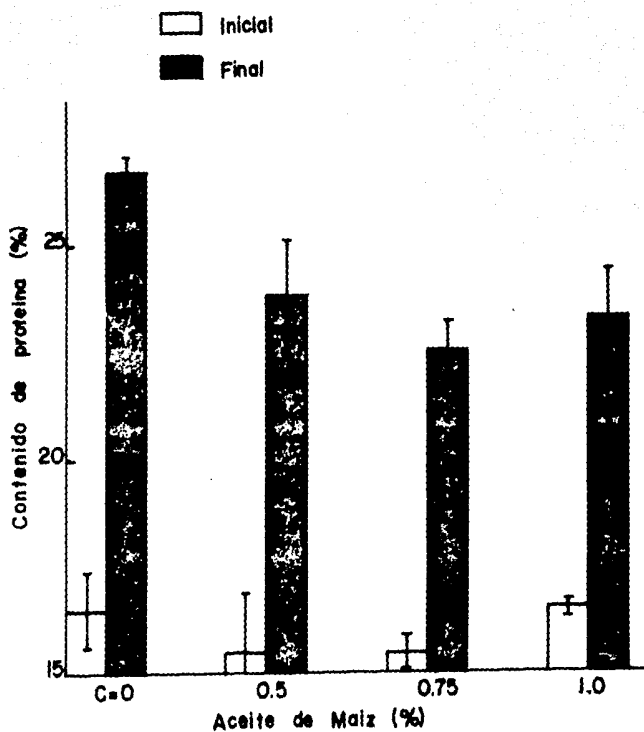


Figura 3.4. Efecto de la adición de aceite de maíz sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína.

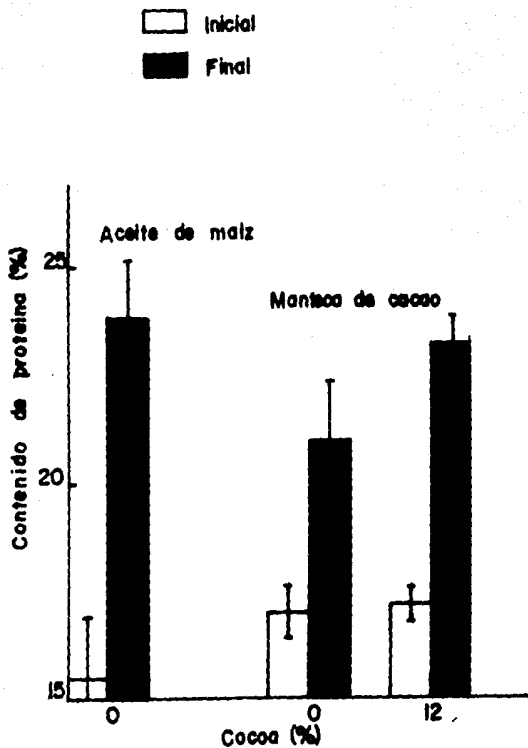


Figura 3.5. Efecto de la adición de cocoa y de la fuente de grasa sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína. Con adición de 0.5% de grasa.

3.3. Estudio de la fermentación del pozol en sustratos de diferentes fuentes de maíz nixtamalizado

En este grupo de experimentos se volvió a estudiar el efecto del contenido inicial de nitrógeno, esta vez con niveles iniciales de proteína cercanos al 15%, que fue el que mayor incremento produjo en los experimentos anteriores. Se analizó nuevamente también la influencia de la fuente de nitrógeno, ya que este efecto no pudo ser analizado previamente debido a que las muestras no presentaban igual contenido inicial de nitrógeno. En los experimentos previos las fermentaciones fueron realizadas en suspensiones diluidas, a diferencia del medio sólido en que se realiza tradicionalmente la fermentación del pozol, lo cual puede significar cambios en varios parámetros con la consecuente alteración de la evolución microbiana y bioquímica de dicha fermentación. La aereación y la cantidad de agua disponible se encuentran entre los parámetros con mayor cambio entre estas condiciones de fermentación. Aunque muchos microorganismos pueden sobrevivir períodos de sequedad, para crecer requieren de un contenido de agua adecuado. Los mohos generalmente pueden desarrollarse en condiciones de menor humedad que las levaduras y las bacterias (26). Por otro lado, los mohos y ciertos grupos bacterianos se desarrollan a niveles de aereación más altos que las bacterias lácticas, las putrefactivas o las levaduras. Para definir los posibles efectos de estos parámetros sobre el aumento en el contenido de proteína, se realizaron dos tipos de pruebas. La primera consistió en emplear materiales con diferente permeabilidad al aire para cubrir los tubos de fermentación. En la segunda, se siguió el curso de la

fermentación bajo tres diferentes condiciones o medios de fermentación:

a) en un sustrato empacado en la forma esférica tradicional del pozol, con un contenido inicial de humedad del 48 al 62%; b) en suspensiones concentradas de sustrato en matraces con un contenido de humedad del 80 al 90% y c) en suspensiones diluidas de sustrato en tubos con un contenido de humedad de aproximadamente 95%. Dentro de este grupo de experimentos se decidió también comparar el desarrollo de la fermentación, utilizando diferentes fuentes de maíz nixtamalizado, para observar la influencia de la composición del maíz sobre ésta.

De acuerdo a las consideraciones anteriores, se elaboró el diseño experimental indicado en la Tabla 3.16. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.17, para la evolución de la acidez titulable y el contenido de proteína, y en la Tabla 3.18, para los cambios en el contenido de humedad y en el valor del pH.

3.1. Efecto del contenido inicial de proteína

Utilizando harina de maíz nixtamalizada como sustrato, se observó que a mayor cantidad inicial de proteína, se presentaba un aumento mayor en el contenido de proteína en el medio de fermentación, llegando a un valor máximo de 27.5% a partir de 17.43% (Figura 3.6). La humedad aumento siempre, llegando a valores entre 95.79 y 97.5%, el pH disminuyó, alcanzando el valor más bajo (3.73) en la muestra con mayor contenido de proteína inicial y la acidez titulable aumentó en todos los casos, sin observarse rela

TABLA 3.16

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL EN SUSTRATOS DE DIFERENTES FUENTES DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Medio	Parámetros			
	Sustrato	Fuente de nitrógeno	Contenido inicial de protefna (%)	Tipo de medio de fermentación
1.1	Harina de maíz nixt.	Casefna	16	S.d.
1.2	Harina de maíz nixt.	Cocoa	16	S.d.
1.3	Harina de maíz nixt.	Harina de soya	15	S.d.
1.4	Harina de maíz nixt.	Peptona de soya	16	S.d.
1.5	Harina de maíz nixt.	Sulfato de amonio	15	S.d.
1.6	Harina de maíz nixt.	Urea	15	S.d.
2.1	Harina de maíz nixt.	Casefna	12	S.d.
2.2	Harina de maíz nixt.	Casefna	15	S.d.
2.3	Harina de maíz nixt.	Casefna	17	S.d.
3*	Harina de maíz nixt.	Casefna	16	S.d.
4.1	Maíz mejorado V-524	- - -	12	S.d.
4.2	Maíz criollo	- - -	10	S.d.
5.1	Harina de maíz nixt.	Casefna	16	S.c.
5.2	Maíz mejorado V-524	- - -	12	S.c.
5.3	Maíz criollo	- - -	10	S.c.
6.1	Harina de maíz nixt.	Casefna	16	M.e.
6.2	Maíz mejorado V-524	- - -	10	H.e.
6.3	Maíz criollo	- - -	11	M.e.

* El empaque siempre fue con película plástica impermeable a gases, excepto en las muestras No. 3, en donde se utilizó hule espuma

S.d. = Suspensión diluída; S.c. = Suspensión concentrada; M.e. = Masa de forma esférica

TABLA 3.17

EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE PROTEINA Y ACIDEZ TITULABLE EN EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL EN SUSTRATOS DE DIFERENTES FUENTES DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Medio	Contenido de proteína (%)		Acidez titulable (%)	
	inicial	a los 14 días	inicial	a los 14 días
1.1	16.10 ± 1.06	26.63 ± 0.46	0.05 ± 0.00	1.13 ± 0.11
1.2	15.70 ± 0.67	20.76 ± 1.62	0.15 ± 0.02	0.93 ± 0.05
1.3	15.13 ± 0.36	27.43 ± 2.34	0.04 ± 0.00	1.10 ± 0.10
1.4	15.97 ± 0.23	27.97 ± 2.05	0.09 ± 0.00	0.80 ± 0.03
1.5	14.53 ± 0.80	21.06 ± 0.66	0.12 ± 0.01	0.60 ± 0.02
1.6	15.30 ± 0.40	26.90 ± 1.39	0.02 ± 0.00	1.13 ± 0.05
2.1	11.62 ± 0.65	22.10 ± 1.39	0.05 ± 0.00	0.71 ± 0.01
2.2	14.68 ± 1.31	25.73 ± 2.79	0.05 ± 0.00	1.02 ± 0.09
2.3	17.43 ± 0.23	27.50 ± 1.41	0.05 ± 0.00	1.05 ± 0.14
3	16.44 ± 1.40	30.38 ± 1.41	0.08 ± 0.00	0.85 ± 0.01
4.1	11.64 ± 0.61	16.98 ± 0.69	0.02 ± 0.00	0.62 ± 0.02
4.2	9.59 ± 1.26	14.18 ± 1.06	0.02 ± 0.00	0.82 ± 0.07
5.1	15.51 ± 0.46	19.36 ± 2.51	0.11 ± 0.00	2.07 ± 0.03
5.2	11.62 ± 0.42	14.98 ± 0.80	- - -	1.29 ± 0.14
5.3	10.42 ± 0.85	12.84 ± 0.46	- - -	1.91 ± 0.19
6.1	15.88 ± 1.61	19.64 ± 1.51	0.40 ± 0.03	2.45 ± 0.12
6.2	10.13 ± 1.40	13.51 ± 0.61	- - -	0.62 ± 0.04
6.3	10.71 ± 1.01	15.98 ± 1.14	- - -	1.02 ± 0.03

TABLA 3.18

EVOLUCION DEL pH Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL EN SUSTRATOS DE DIFERENTES FUENTES DE MAIZ NIXTAMALIZADO

Medio	pH		Humedad (%)	
	inicial	a los 14 días	inicial	a los 14 días
1.1	5.80 ± 0.10	3.76 ± 0.06	94.55 ± 0.50	96.79 ± 0.18
1.2	6.63 ± 0.11	4.36 ± 0.06	91.44 ± 1.14	92.70 ± 0.36
1.3	6.07 ± 0.25	3.90 ± 0.17	94.19 ± 0.30	96.82 ± 0.24
1.4	6.17 ± 0.05	4.06 ± 0.61	94.66 ± 0.07	96.87 ± 0.11
1.5	5.60 ± 0.20	3.46 ± 0.06	95.00 ± 0.38	95.94 ± 0.66
1.6	6.03 ± 0.11	4.16 ± 0.06	95.21 ± 0.13	97.77 ± 0.17
2.1	5.27 ± 0.11	4.03 ± 0.32	95.57 ± 0.40	97.50 ± 0.20
2.2	5.13 ± 0.05	3.86 ± 0.06	95.16 ± 0.19	97.03 ± 0.32
2.3	4.97 ± 0.15	3.73 ± 0.15	94.91 ± 0.34	97.15 ± 0.68
3	4.57 ± 0.15	3.80 ± 0.00	95.17 ± 0.29	97.04 ± 0.35
4.1	6.00 ± 0.36	4.16 ± 0.40	93.56 ± 0.50	95.79 ± 0.39
4.2	4.87 ± 0.15	4.16 ± 0.06	93.02 ± 0.20	95.41 ± 0.29
5.1	6.13 ± 0.05	4.06 ± 0.06	79.74 ± 1.45	83.14 ± 1.17
5.2	10.17 ± 0.40	4.50 ± 0.60	84.90 ± 6.19	85.08 ± 0.61
5.3	8.03 ± 0.56	4.03 ± 0.25	90.42 ± 3.70	83.22 ± 0.29
6.1	5.83 ± 0.05	3.83 ± 0.20	62.87 ± 2.71	55.02 ± 1.77
6.2	10.13 ± 0.20	5.20 ± 0.11	54.49 ± 0.29	49.44 ± 1.99
6.3	10.17 ± 0.89	5.03 ± 0.15	48.30 ± 0.24	40.82 ± 4.28

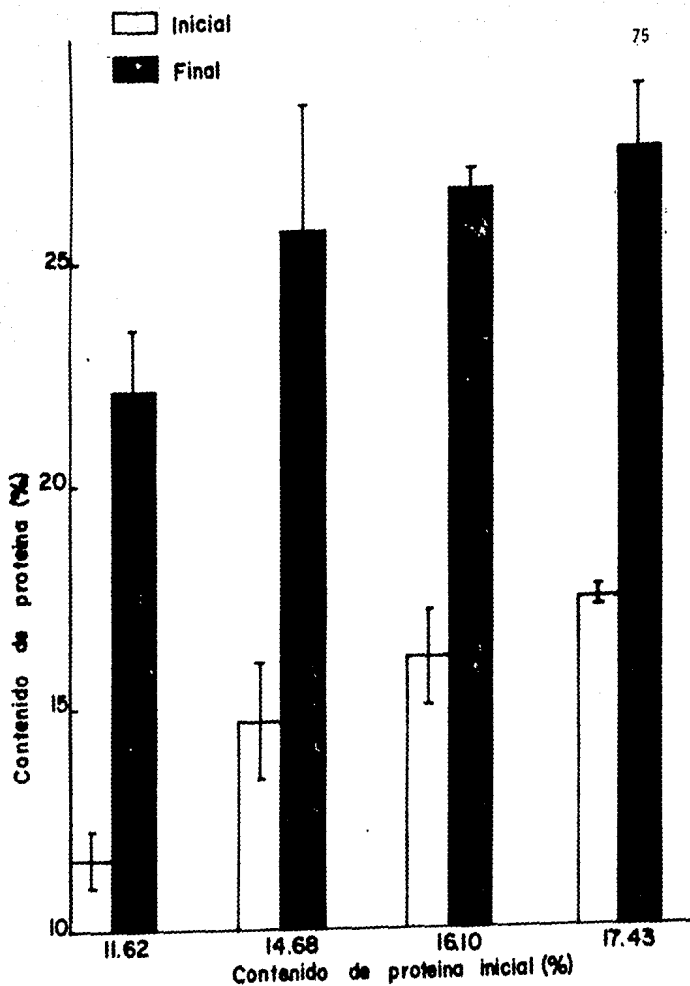


Figura 3.6. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína, a diferentes contenidos de proteína inicial.

ción alguna con el contenido de proteína inicial.

3.3.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

Al suplementar un sustrato de harina de maíz nixtamalizado con diferentes fuentes de nitrógeno, se observaron valores finales muy similares con caseína, harina de soya, peptona de soya y urea (entre 26.63 y 27.97%), mientras que con sulfato de amonio y cccoa los valores alcanzados fueron menores (de 21.06 y 20.76% de proteína, respectivamente) (Figura 3.7). El contenido de humedad aumentó en todas las muestras, sobretodo en las que se suplementó con harina de soya y con urea (de 94.19 a 96.82% y de 95.21 a 97.77% de humedad, respectivamente), el pH final descendió hasta valores entre 3.46 a 4.6 y la acidez titulable aumentó considerablemente con caseína, urea y harina de soya, llegando a un valor mayor al 1%, mientras que con sulfato de amonio el aumento fué muy pequeño (de 0.124 a 0.6%).

3.3.3. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque

Este efecto se evaluó también con un sustrato de harina de maíz nixtamalizado. Se pudo observar que cubriendo los tubos con hule espuma hay un aumento mayor en el contenido de proteína que cubriéndolos con película plástica impermeable a gases (de 16.44 a 30.38 y de 16.1 a 26.63%, respectivamente) (Figura 3.8). La humedad también aumentó más en los tubos cubiertos con hule espuma (de 95.17 a 97.04%), el pH bajó en ambos casos, llegando a un valor muy similar (3.9 y 3.76) y la acidez titulable aumentó menos en

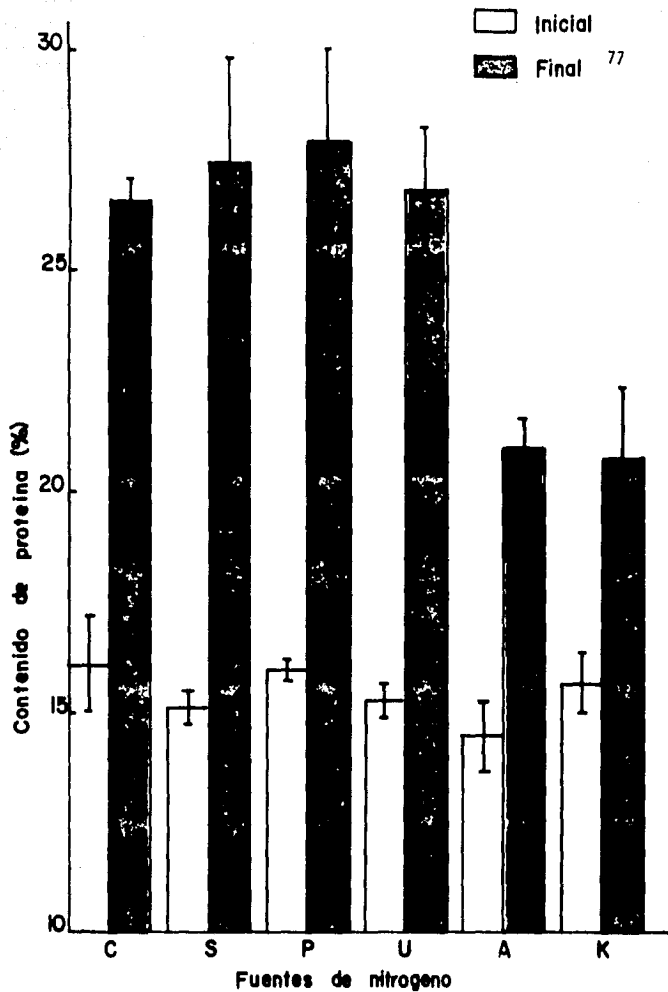


Figura 3.7. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con diferentes fuentes de nitrógeno. C = caseína; S = harina de soya; P = peptona de soya; U = urea; A = sulfato de amonio; K = cocoa.

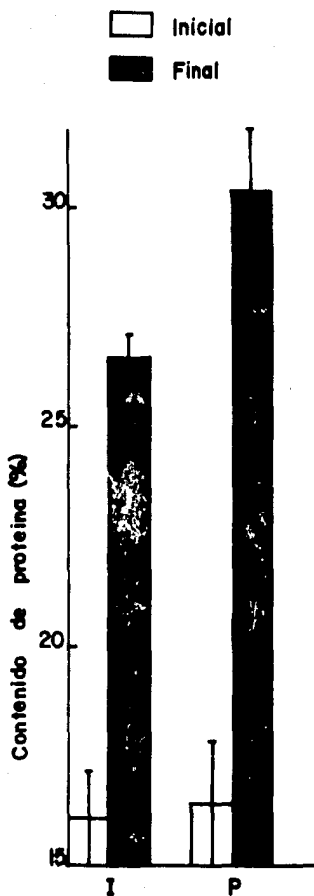


Figura 3.8. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína. Los tubos fueron cubiertos con película plástica impermeable a gases (I) o con hule espuma (P).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

los tubos cubiertos con hule espuma que en los cubiertos con película plástica (de 0.08 a 0.85 y de 0.05 a 1.13%, respectivamente).

3.3.4. Influencia de las condiciones de fermentación

Se utilizaron sustratos de harina de maíz nixtamalizado, maíz nixtamalizado mejorado V-524 y maíz nixtamalizado criollo "Tuxpeñito", para seguir la evolución de la fermentación en suspensiones (diluidas y concentradas) en comparación con las condiciones de la fermentación tradicional del pozol, un sustrato sólido con un contenido de humedad de aproximadamente 60%.

Con medios de harina de maíz nixtamalizado el incremento de proteína fue mucho mayor en las suspensiones diluidas (de 16.1 a 26.63%) que en las concentradas y que en las masas de forma esférica, con un contenido de proteína final de 19.36 y 19.64, respectivamente (Figura 3.9). En ambas suspensiones la humedad aumentó (de 94.55 a 96.79% en las diluidas y de 79.74 a 83.14% en las concentradas), pero disminuyó en las masas de forma esférica (de 62.87 a 55.02%). En todos los casos el pH disminuyó, alcanzando el valor más bajo las suspensiones diluidas (3.76). La acidez titulable aumentó más en las masas de forma esférica, llegando hasta un 2.45%.

Con medios de maíz mejorado V-524 nixtamalizado se observó nuevamente que a mayor cantidad de humedad, el contenido de proteína final fue también mayor, alcanzándose los valores mayores en las suspensiones diluidas (16.98% como valor final, a partir de un contenido inicial de 11.64%) (Figura 3.10).

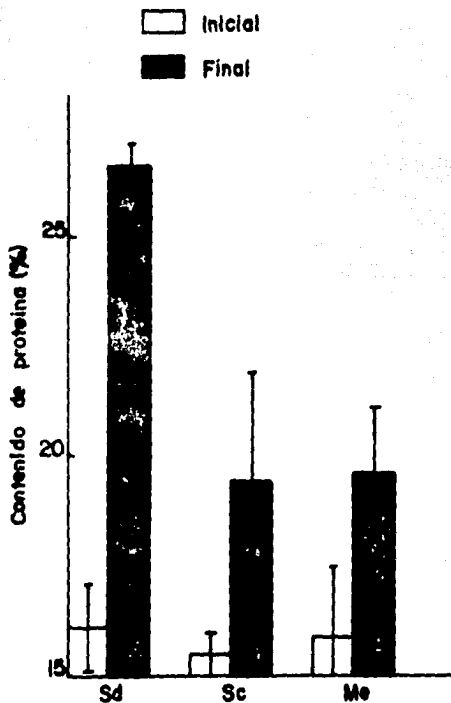


Figura 3.9. Influencia de las condiciones de fermentación sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína. Sd = suspensiones diluidas (H = 95%, en tubos de ensaye); Sc = suspensiones concentradas (H = 80%, en matraces); Me = masas de forma esférica (H = 60%).

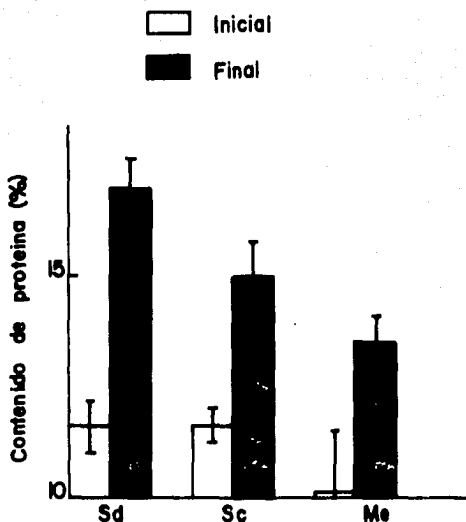


Figura 3.10. Influencia de las condiciones de fermentación sobre el contenido final de proteína en la fermentación de maíz mejorado V-524 nixtamalizado. Sd = suspensiones diluidas (94% de humedad, en tubos); Sc = suspensiones concentradas (85% de humedad, en matraces); Me = masas de forma esférica (55% de humedad).

La humedad también aumentó en las suspensiones diluidas y en las concentradas (de 93.56 a 95.79% y de 84.9 a 85.08%, respectivamente), y disminuyó en las masas de forma esférica (de 54.49 a 49.94%), el pH bajó en todas las muestras pero el decremento fue mayor en las suspensiones concentradas y en las masas de forma esférica (de 10.17 a 4.5 y de 10.13 a 5.2, respectivamente). La acidez aumentó sobretodo en las suspensiones concentradas, pasando de 0 a 1.29%.

Con medios de maíz criollo "Tuxpeñito" nixtamalizado, en contraste con lo observado previamente, el mayor aumento en el contenido de proteína lo presentaron las masas en forma esférica, que de un valor inicial de 10.71%, alcanzaron un valor de 15.98% de proteína final (Figura 3.11). Las suspensiones diluidas presentaron de nuevo un incremento mayor de proteína que las concentradas (14.18 y 12.84%, respectivamente). El contenido de humedad disminuyó en las suspensiones concentradas y en las masas de forma esférica (de 90.42 a 83.22% y de 48.3 a 40.82%, respectivamente), y aumentó en las suspensiones diluidas (de 93.02 a 95.41%). El pH disminuyó, sobretodo en las suspensiones concentradas (de 8.93 a 4.03) y en las masas de forma esférica (de 10.17 a 5.03). El mayor aumento en la acidez titulable se presentó en las suspensiones concentradas (de 0 a 1.91%).

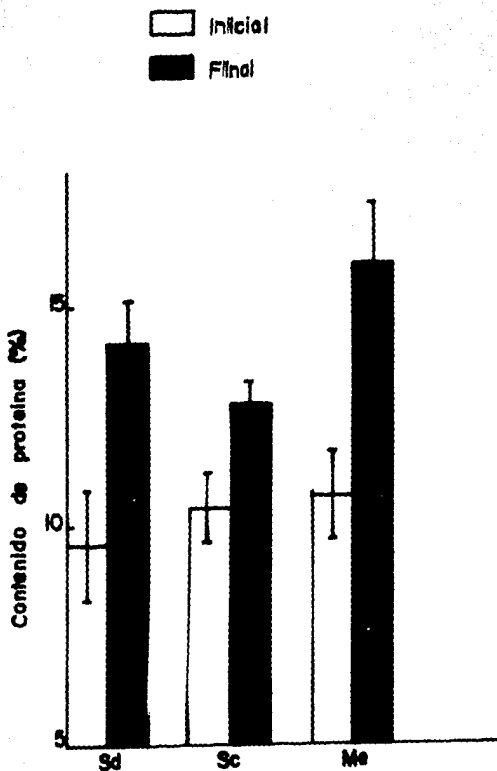


Figura 3.11. Influencia de las condiciones de fermentación sobre el contenido final de proteína en la fermentación de maíz criollo "Tuxpeñito" nixtamalizado. Sd = suspensiones diluidas (H = 93%, en tubos de ensaye); Sc = suspensiones concentradas (H = 85%, en matraces); Me = masas de forma esférica (H = 50%).

3.4. Fermentación del pozol sobre distintos sustratos amiláceos

En el grupo de experimentos anterior fue posible observar que, al suplementar el sustrato de harina de maíz nixtamalizado con urea, se alcanzaban incrementos de proteína semejantes a los obtenidos con caseína y otras fuentes orgánicas de proteína. Ya que la urea es una fuente de nitrógeno de bajo costo, se decidió corroborar los resultados obtenidos anteriormente, en diferentes sustratos. El efecto del contenido inicial de proteína fue nuevamente estudiado, extendiéndose ahora a niveles mayores a los ensayados previamente; se utilizaron, para ello, sustratos de harina de maíz nixtamalizado y de sorgo. Se estudió la influencia de la temperatura de incubación, comparando temperaturas propias de la zona en donde se produce pozol (28-35°C) y otra más elevada (45°C), que favorece el desarrollo de la fermentación homoláctica. También se estudió el efecto de la inoculación de los medios de fermentación, empleándose tres tipos de inóculo: a) *Agrobacterium azotophilum*, b) un cultivo mixto de pozol, c) una mezcla de ambos y d) yoghurt; este efecto se estudió en sustratos de harina de maíz nixtamalizado y de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado. Se corroboró el efecto de la diferente permeabilidad al aire del material de empaque. Se estudió el efecto de la nixtamalización en el maíz y en el sorgo, debido a que, como se ha indicado anteriormente, la fijación de nitrógeno sólo se ha reportado en el maíz nixtamalizado. También se estudió el efecto del contenido de taninos en el sorgo, ya que éstos forman complejos con las proteínas (20). Para estudiar el posible renuerimiento de alguno de los componentes del maíz, en particular de su proteína, para que se lleve a cabo la fermenta-

ción del pozol, se prepararon sustratos a partir de almidón y gluten de maíz. Por último, se estudió la fermentación con los microorganismos del pozol sobre otros sustratos amiláceos (plátano y col) para su posible aplicación sobre desechos alimenticios.

En la Tabla 3.19 se presenta el diseño experimental utilizado y en las Tablas 3.20 y 3.21 se indican los resultados obtenidos en los cambios en el contenido de proteína y de acidez titulable, y en los valores de pH y contenido de humedad, respectivamente.

3.4.1. Efecto del contenido inicial de proteína

Este efecto se estudió en dos tipos de sustrato: uno preparado con harina de maíz nixtamalizado y otro con sorgo nixtamalizado. En ambos casos, se corroboró el resultado obtenido en el grupo anterior de experimentos, pues to que a mayor contenido inicial de proteína, su valor al término de la fermentación también fue mayor (Figura 3.12). Así, para los sustratos de harina de maíz nixtamalizado, a contenidos iniciales de proteína de 16.2 y 22.43, les correspondieron valores finales de 23.87 y 37.88%, respectivamente; por su parte, la acidez titulable presentó mayor incremento en el medio cuyo contenido de proteína inicial era mayor (de 0.04 a 0.9%), el pH llegó en ambos casos a un valor de 3.8 y el contenido de humedad aumentó más en los tubos con mayor contenido de proteína inicial (de 94.08 a 96.94%). En los sustratos de sorgo nixtamalizado se obtuvieron aumentos en el contenido de proteína de 12.13 a 19.67%, de 16.8 a 24.27% y de 20.33 a

TABLA 3.13

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN DEL POZOL SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS AMILÁCEOS

Medio	Fuente de carbono primaria	Fuente de carbono secundaria	Fuente de nitrógeno	Contenido inicial de protefina (%)	Tipo de medio de fermentación	Mezcla y tiempo de coccción (min.)	Mezcla y tiempo de reacción (hs.)	Inóculo
1.1	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	15-16	S.d.	-- --	-- --	AP
1.2*	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	15-16	S.d.	-- --	-- --	AP
1.3	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	22	S.d.	-- --	-- --	AP
2.1	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	19-21	S.d.	30	15	AP
2.2	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	19-21	S.d.	20	10	AP
2.3	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	19-21	S.d.	10	5	AP
2.4	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	19-21	S.d.	-- --	-- --	AP
2.5	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	19-21	M.e.	30	15	AP
2.6	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	15	S.d.	30	15	AP
3.1	Maíz de Guerrero	-- --	Urea	21-23	M.e.	30	15	AP
3.2	Maíz de Guerrero	Yoghurt	Casafna	21-23	M.e.	30	15	--
3.3	Maíz de Guerrero	-- --	Casafna	21-23	M.e.	30	15	--
3.4	Maíz de Guerrero	-- --	Urea	19	S.d.	30	15	FP
4.1	Harina de maíz nixt.	Plátano	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
4.2	Harina de maíz nixt.	Plátano	Urea	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
4.3	Plátano	H. de maíz nixt.	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
4.4	Plátano	H. de maíz nixt.	Urea	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
4.5	Plátano	-- --	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	FP
5.1	Harina de maíz nixt.	Col	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
5.2	Harina de maíz nixt.	Col	Urea	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
5.3	Col	H. de maíz nixt.	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
5.4	Col	H. de maíz nixt.	Urea	14-16	S.d.	-- --	-- --	AP
5.5	Col	-- --	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	FP
6.1	Harina de maíz nixt.	-- --	Urea	16.5	S.d.	-- --	-- --	AP
6.2	Harina de maíz nixt.	-- --	Urea	18.5	S.d.	-- --	-- --	AP
7.1	Sorgo	-- --	Casafna	17	S.d.	50	12	AP
7.2**	Sorgo	-- --	Casafna	13	S.d.	50	12	AP
7.3	Sorgo	-- --	Casafna	12	S.d.	50	12	AP
7.4	Sorgo	-- --	Casafna	20	S.d.	50	12	AP
8	Sorgo	-- --	Urea	17	S.d.	50	12	AP
9	Sorgo	-- --	Urea	14	S.d.	-- --	-- --	AP
10.1	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	A
10.2	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	P
10.3	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	14-16	S.d.	-- --	-- --	--
11.1***	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	16	S.d.	-- --	-- --	AP
11.2***	Harina de maíz nixt.	-- --	Casafna	16	S.d.	-- --	-- --	AP
12.1	Almidón	Glúten	Casafna	15	S.d.	-- --	-- --	AP
12.2	Almidón	-- --	Casafna	15	S.d.	-- --	-- --	FP

* Todos los medios se envasaron con película plástica impermeable a gases, excepto el 1.2, empacado con hule espuma
 ** El sorgo utilizado fue de bajo contenido de taninos, excepto el del medio 7.2, que fue de alto contenido de taninos
 *** Todos los medios se incubaron a 28°C, excepto el 11.1, que se incubó a 35°C, y el 11.2, a 45°C
 S.d. = Suspensión diluida; M.e. = masa en forma esférica
 A = *Agrostacterium azotophilum*; P = microflora mixta de pozol

TABLA 3.20

EVOLUCION DE LOS CONTENIDOS DE PROTEINA Y ACIDEZ TITULABLE EN EL ESTUDIO DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL PCZCL SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS AMILACEOS

Medio	Contenido de proteina (%)		Acidez Titulable (%)	
	inicial	a los 14 dias	inicial	a los 14 dias
1.1	16.20 ± 2.03	23.87 ± 1.97	0.05 ± 0.00	0.71 ± 0.22
1.2	15.20 ± 1.56	26.27 ± 2.27	0.05 ± 0.00	0.51 ± 0.21
1.3	22.43 ± 0.00	37.88 ± 1.95	0.04 ± 0.00	0.90 ± 0.00
2.1	19.06 ± 0.48	34.22 ± 1.21	0.91 ± 0.00	0.57 ± 0.14
2.2	21.47 ± 1.28	31.09 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.69 ± 0.12
2.3	20.66 ± 1.69	30.00 ± 0.85	0.02 ± 0.00	0.70 ± 0.04
2.4	20.50 ± 0.96	29.65 ± 0.49	0.02 ± 0.00	0.52 ± 0.07
2.5	19.78 ± 0.24	29.41 ± 0.35	0.36 ± 0.09	1.10 ± 0.22
2.6	15.20 ± 0.00	21.06 ± 0.24	0.02 ± 0.00	0.84 ± 0.17
3.1	21.14 ± 0.32	22.27 ± 1.11	0.09 ± 0.00	2.02 ± 0.45
3.2	22.75 ± 1.11	40.96 ± 1.70	0.43 ± 0.19	3.45 ± 0.45
3.3	21.22 ± 1.21	22.19 ± 1.21	0.26 ± 0.04	3.23 ± 0.11
3.4	19.38 ± 0.28	37.11 ± 0.35	0.01 ± 0.00	0.36 ± 0.10
4.1	15.20 ± 1.51	25.33 ± 1.29	0.11 ± 0.03	0.35 ± 0.05
4.2	14.20 ± 0.92	20.93 ± 2.44	0.05 ± 0.00	0.56 ± 0.08
4.3	16.00 ± 0.40	21.07 ± 1.16	0.11 ± 0.03	0.15 ± 0.20
4.4	14.53 ± 1.16	14.80 ± 1.14	0.11 ± 0.03	0.28 ± 0.16
4.5	14.40 ± 0.00	19.00 ± 1.93	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.03
5.1	15.73 ± 0.81	30.93 ± 2.72	0.09 ± 0.00	0.83 ± 0.17
5.2	15.00 ± 1.71	30.93 ± 2.60	0.11 ± 0.03	0.93 ± 0.20
5.3	15.60 ± 0.72	22.40 ± 1.20	0.19 ± 0.00	0.43 ± 0.03
5.4	15.00 ± 1.04	19.93 ± 0.81	0.19 ± 0.00	0.29 ± 0.03
5.5	14.13 ± 0.92	19.60 ± 1.06	0.22 ± 0.03	0.39 ± 0.05
6.1	16.27 ± 1.41	24.60 ± 1.40	0.05 ± 0.00	0.94 ± 0.13
6.2	18.33 ± 2.70	29.13 ± 1.27	0.05 ± 0.00	1.00 ± 0.03
7.1	16.80 ± 1.44	24.27 ± 0.94	0.06 ± 0.03	0.60 ± 0.16
7.2	13.07 ± 0.23	20.40 ± 1.44	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.13
7.3	12.13 ± 1.97	19.67 ± 0.61	0.02 ± 0.00	0.45 ± 0.05
7.4	20.33 ± 0.70	29.40 ± 0.40	0.05 ± 0.00	0.46 ± 0.12
8	16.93 ± 0.61	23.62 ± 0.86	0.05 ± 0.00	0.62 ± 0.15
9	13.80 ± 0.53	16.81 ± 0.52	0.05 ± 0.00	0.89 ± 0.03
10.1	14.67 ± 1.41	20.67 ± 2.20	0.05 ± 0.00	0.94 ± 0.16
10.2	15.53 ± 1.89	29.71 ± 2.40	0.05 ± 0.00	0.97 ± 0.08
10.3	15.87 ± 0.83	30.87 ± 2.95	0.03 ± 0.01	1.25 ± 0.08
11.1	15.93 ± 0.99	19.47 ± 0.83	0.02 ± 0.00	0.91 ± 0.05
11.2	16.33 ± 0.50	19.07 ± 0.46	0.05 ± 0.00	0.37 ± 0.16
12.1	15.70 ± 0.14	24.40 ± 0.20	0.08 ± 0.03	0.19 ± 0.09
12.2	15.27 ± 1.29	19.60 ± 0.73	0.05 ± 0.00	0.14 ± 0.05

TABLA 3.21

EVOLUCION DEL pH Y DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL ESTUDIO DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DEL PCZOL SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS AMILACEOS

Medio	pH		Humedad (%)	
	inicial	a los 14 días	inicial	a los 14 días
1.1	6.00 ± 0.00	3.80 ± 0.30	94.75 ± 0.48	95.26 ± 0.13
1.2	6.10 ± 0.00	4.03 ± 0.21	94.46 ± 0.64	96.82 ± 0.05
1.3	5.70 ± 0.20	3.87 ± 0.15	94.00 ± 0.28	96.94 ± 0.18
2.1	5.07 ± 0.15	3.90 ± 0.10	96.39 ± 0.10	97.91 ± 0.11
2.2	5.53 ± 0.12	3.83 ± 0.06	96.39 ± 0.33	97.96 ± 0.36
2.3	5.60 ± 0.10	3.80 ± 0.00	96.52 ± 0.11	97.66 ± 0.22
2.4	5.53 ± 0.06	3.67 ± 0.06	95.71 ± 0.22	97.60 ± 0.29
2.5	6.43 ± 0.25	5.37 ± 0.15	45.33 ± 0.48	44.80 ± 0.49
2.6	6.53 ± 0.29	3.93 ± 0.06	94.25 ± 0.92	96.79 ± 0.65
3.1	7.90 ± 0.17	7.16 ± 1.21	46.71 ± 0.09	43.05 ± 0.46
3.2	6.17 ± 1.42	4.70 ± 0.17	43.63 ± 0.53	45.07 ± 0.19
3.3	7.27 ± 0.95	4.37 ± 0.15	45.71 ± 0.02	41.92 ± 1.85
3.4	6.53 ± 0.12	4.70 ± 0.35	96.89 ± 0.05	98.64 ± 0.06
4.1	5.53 ± 0.06	4.33 ± 0.06	94.77 ± 0.07	94.43 ± 0.22
4.2	5.80 ± 0.00	4.83 ± 0.15	94.95 ± 0.19	97.15 ± 0.19
4.3	5.20 ± 0.00	5.10 ± 1.05	94.30 ± 0.11	95.74 ± 0.24
4.4	5.20 ± 0.00	5.77 ± 0.76	94.79 ± 0.34	96.50 ± 0.32
4.5	4.90 ± 0.00	6.73 ± 0.15	94.29 ± 0.25	95.71 ± 0.37
5.1	5.37 ± 0.15	4.23 ± 0.21	94.97 ± 0.09	97.20 ± 0.15
5.2	5.77 ± 0.05	4.23 ± 0.06	95.14 ± 0.14	97.56 ± 0.09
5.3	5.23 ± 0.06	4.77 ± 0.23	94.87 ± 0.30	96.37 ± 0.29
5.4	5.33 ± 0.05	5.00 ± 0.20	94.99 ± 0.24	96.58 ± 0.27
5.5	5.17 ± 0.12	4.77 ± 0.12	94.95 ± 0.43	96.47 ± 0.27
6.1	6.43 ± 0.06	4.47 ± 0.58	94.78 ± 0.11	97.46 ± 0.15
6.2	6.43 ± 0.06	4.53 ± 0.06	94.89 ± 0.40	97.48 ± 0.29
7.1	6.60 ± 0.10	4.10 ± 0.35	94.35 ± 0.25	96.01 ± 0.34
7.2	6.53 ± 0.12	4.00 ± 0.10	94.29 ± 1.00	94.85 ± 0.25
7.3	7.33 ± 0.06	4.10 ± 0.00	94.78 ± 0.39	96.12 ± 0.24
7.4	6.13 ± 0.06	4.27 ± 0.15	93.96 ± 0.25	95.78 ± 0.32
8	5.77 ± 0.06	4.67 ± 0.06	94.51 ± 0.18	96.51 ± 0.33
9	5.67 ± 0.21	3.70 ± 0.10	89.57 ± 0.17	91.53 ± 0.10
10.1	6.00 ± 0.00	3.53 ± 0.05	94.09 ± 0.14	96.32 ± 0.17
10.2	6.00 ± 0.00	3.57 ± 0.12	94.73 ± 0.36	96.82 ± 0.33
10.3	6.27 ± 0.06	3.63 ± 0.06	94.50 ± 0.45	96.46 ± 0.37
11.1	5.93 ± 0.06	3.63 ± 0.06	94.77 ± 0.28	94.05 ± 0.31
11.2	5.63 ± 0.06	4.40 ± 0.56	94.93 ± 0.85	94.56 ± 0.37
12.1	5.00 ± 0.00	4.17 ± 0.25	94.41 ± 0.56	96.61 ± 0.20
12.2	3.93 ± 0.06	3.83 ± 0.29	94.61 ± 0.16	94.99 ± 0.38

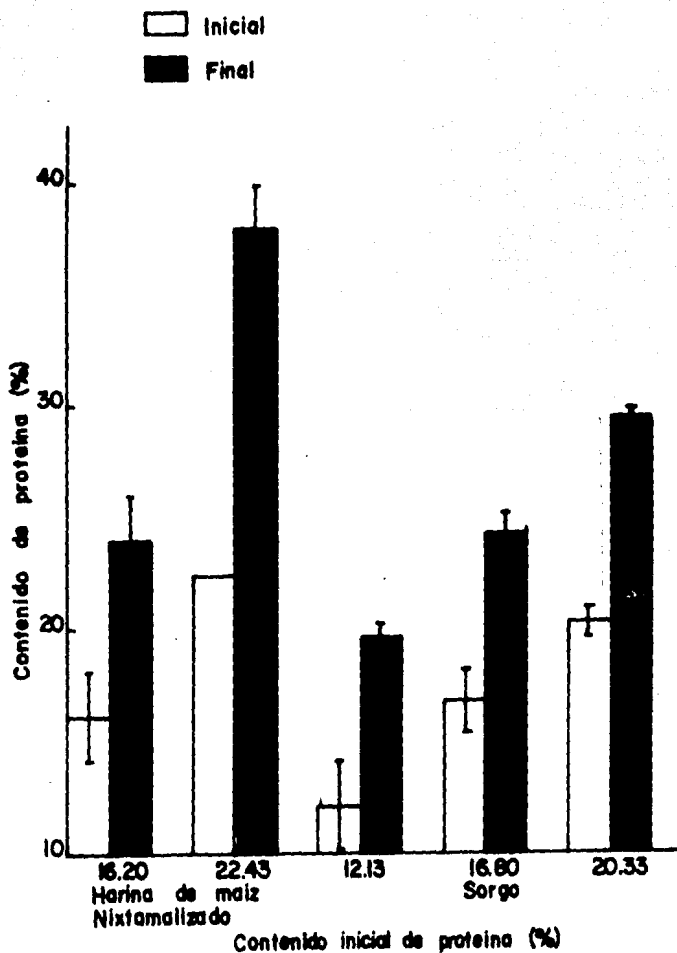


Figura 3.12. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado y sorgo nixtamalizado, suplementados con caseína, a diferentes contenidos de proteína inicial.

29.4% (Figura 3.12). En este caso, la acidez titulable y el contenido de humedad aumentaron sin observarse relación alguna con el contenido inicial de proteína, mientras que los valores de pH bajaron más cuando el contenido de proteína inicial fue menor (de 7.33 a 4.1).

3.4.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

Este parámetro fue estudiado en sustratos preparados con harina de maíz nixtamalizado, maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado y sorgo nixtamalizado.

Con los sustratos de harina de maíz nixtamalizado se observó que el aumento en el contenido de proteína utilizando caseína y urea fue similar (de 16.2 a 23.87 y de 16.27 a 24.6%, respectivamente) (Figura 3.13). La acidez titulable aumentó más cuando se suplementó con urea (de 0.05 a 0.94%), el pH disminuyó menos (de 6.43 a 4.47) y el aumento en el contenido de humedad fue mayor (de 94.78 a 97.46%).

Al emplear sustratos de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado, cuando el tipo de medio de fermentación fue de soluciones diluidas (6% de sólidos), el aumento en el contenido de proteína fue ligeramente mayor con urea que con caseína (de 19.38 a 37.11% y de 19.06 a 34.22%, respectivamente), aunque cuando la fermentación se realizó en masas de forma esférica, el incremento fue mucho mayor con caseína que con urea (de 19.78 a 29.41% y de 21.14 a 22.27%, respectivamente) (Figura 3.14). En las suspensiones diluidas la acidez titulable aumentó más con caseína (de 0.01 a 0.57%) que con urea (de 0.01 a 0.36%), el pH alcanzó valores más bajos (de 5.07 a 3.9 y de

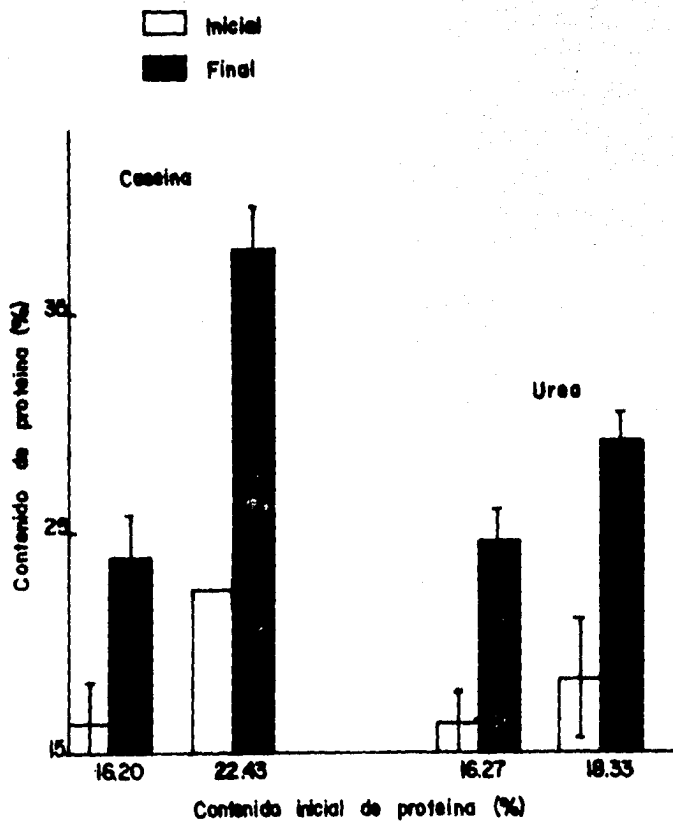


Figura 3.13. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína o urea, a diferentes contenidos de proteína inicial.

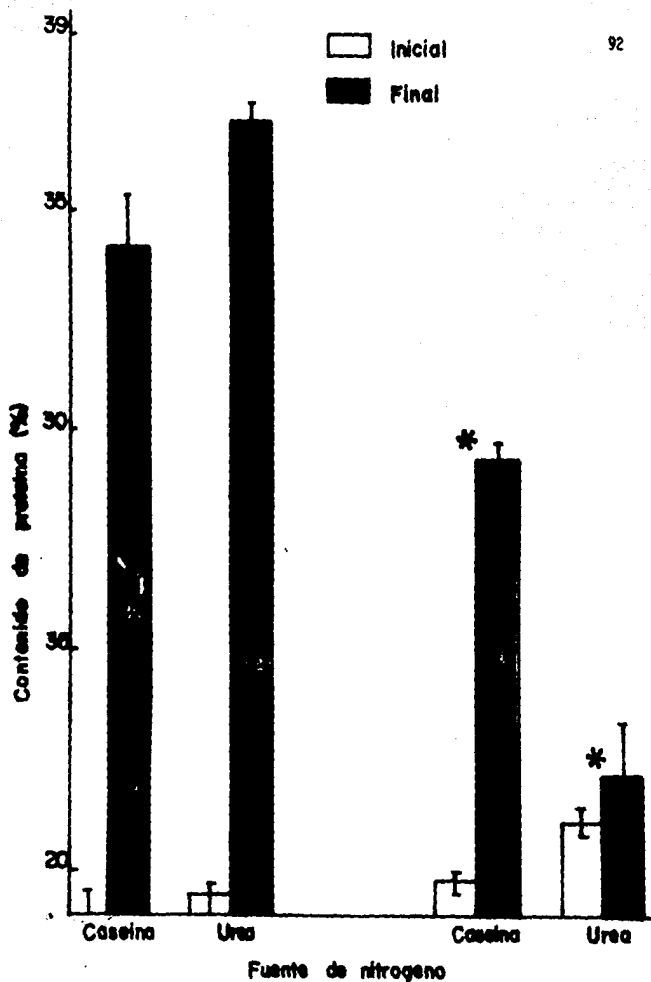


Figura 3.14. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado, suplementado con caseína o urea. (*) Fermentación realizada empacando la masa nixtamalizada (H = 45-46%) en forma esférica.

6.57 a 4.7, respectivamente), y el aumento en el contenido de humedad fue menor (de 96.39 a 97.91% y de 96.89 a 98.84%, respectivamente). En las masas de forma esférica la acidez titulable aumentó más con urea (de 0.09 a 2.02%) que con caseína (de 0.36 a 1.1%), el pH disminuyó más con caseína (de 6.43 a 5.37) y la disminución en el contenido de humedad fue mayor con urea (de 46.71 a 43.05%).

En sustratos de sorgo nixtamalizado el contenido final de proteína fue ligeramente mayor con caseína, aunque no significativamente diferente (de 23.62% y 24.27% para el sustrato suplementado con urea y con caseína, respectivamente) (Figura 3.15). La acidez titulable tuvo un incremento muy similar con ambas fuentes de nitrógeno, aunque el pH disminuyó más (de 6.6 a 4.1) con caseína y el aumento en el contenido de humedad fue ligeramente mayor con urea (de 94.51 a 96.51%).

3.4.3. Influencia de la temperatura de incubación

El aumento en el contenido de proteína fue mucho mayor a 28°C (de 16.2 a 23.87%) que a 35 y 45°C (de 15.93 a 19.47% y de 16.33 a 19.07%, respectivamente) (Figura 3.16). El aumento en la acidez titulable fue mayor a 35°C (de 0.02 a 0.91%). También fue mayor la disminución en el pH en las muestras incubadas a 35°C (de 5.93 a 3.36), mientras que el contenido de humedad aumentó en los tubos a 28°C (de 94.75 a 96.26%) y disminuyó ligeramente en los tubos a 35 y 45°C (de 94.77 a 94.05% y de 94.93 a 94.56%).

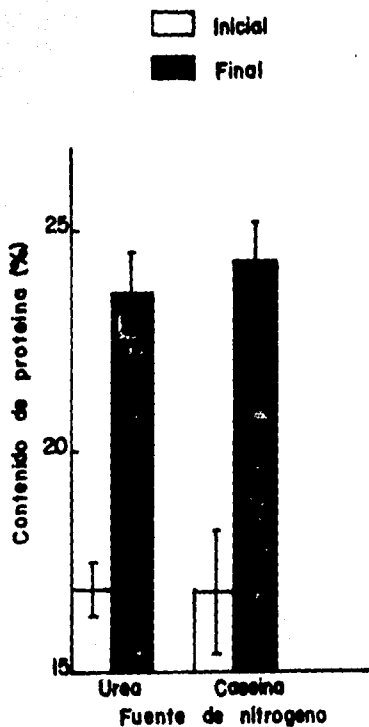


Figura 3.15. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de sorgo (bajo contenido de taninos) nixtamalizado, suplementado con urea o caseína.

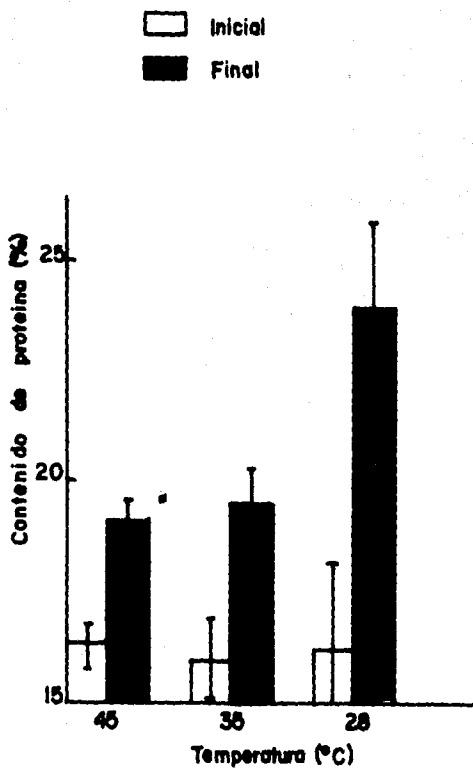


Figura 3.16. Influencia de la temperatura de incubación sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína.

3.4.4. Efecto de la inoculación

Este efecto se estudió en sustratos de harina de maíz nixtamalizado y de maíz TC 85 AR mejorado nixtamalizado. Los primeros recibieron tres tipos de inoculación: a) *Agrobacterium azotophilum*, b) un cultivo mixto de pozol y c) una mezcla de ambos. El aumento en el contenido de proteína fue mayor en el sustrato no inoculado, es decir con fermentación espontánea (de 15.87 a 30.87%), mientras que al utilizar *Agrobacterium azotophilum* el aumento fue menor (de 14.67 a 20.67%). Las muestras inoculadas con una mezcla de *Agrobacterium azotophilum* y cultivo mixto de pozol presentaron un mayor aumento en el contenido de proteína (de 16.2 a 23.87%) que las inoculadas sólo con *Agrobacterium azotophilum*, y un aumento menor que las inoculadas sólo con cultivo mixto de pozol (de 15.53 a 29.71%) (Figura 3.17). En todos los casos hubo aumento en la acidez titulable, sobretodo en las muestras sin inocular, en las que se llegó a un valor de 1.25%. Los valores de pH fueron muy similares (entre 3.53 y 3.8) y el contenido de humedad aumentó de manera similar en todas las muestras.

Los sustratos de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado se prepararon como masas de forma esférica y recibieron dos tipos de inóculo: a) una mezcla de *Agrobacterium azotophilum* con flora mixta de pozol y b) yoghurt. En este caso, se presentó un mayor aumento en el contenido de proteína en las masas inoculadas con yoghurt (de 22.75 a 40.96%), mientras que en las muestras sin inocular el aumento fue el menor (de 21.22 a 22.19%). Las masas inoculadas con *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol alcanzaron

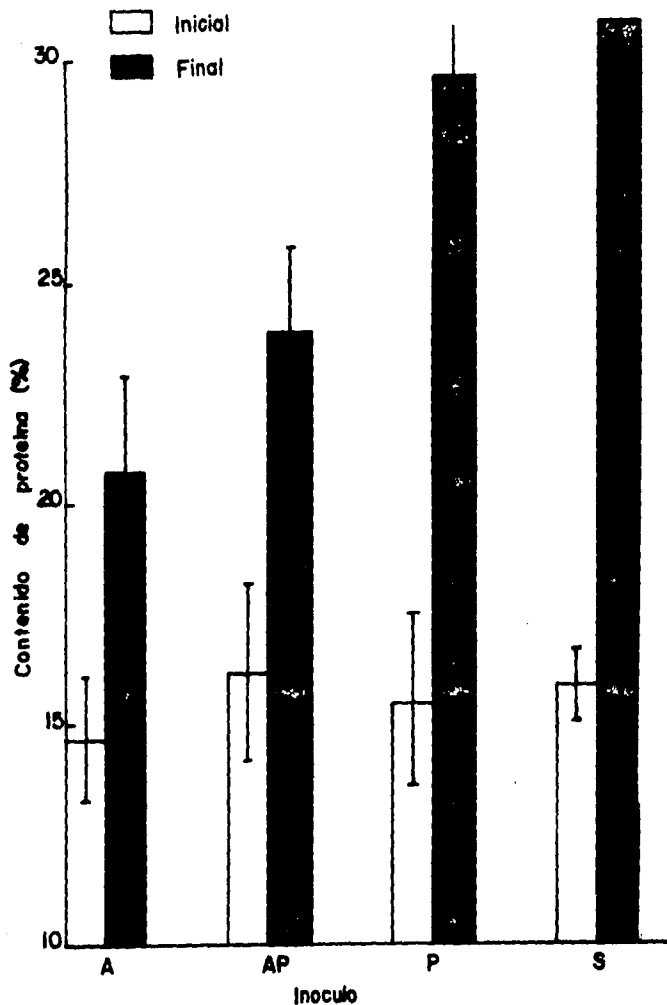


Figura 3.17. Efecto de la inoculación sobre el contenido final de proteina en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína. A = *Agrobacterium azotophili* Σ m; P = cultivo mixto de pozol; AP = mezcla de A y P; S = sin inóculo.

un valor intermedio (de 19.78 a 29.41%) (Figura 3.18). El aumento en la acidez titulable fue similar en las masas sin inóculo y en las inoculadas con yoghurt (de 0.26 a 3.23% y de 0.43 a 3.45%, respectivamente) y fue menor en las muestras con la mezcla de inóculos (de 0.36 a 1.31%). Las muestras sin inóculo presentaron una mayor disminución en los valores de pH (de 7.27 a 4.37) que las masas inoculadas con yoghurt (de 6.17 a 4.7) y con la mezcla de inóculos (de 6.43 a 5.37). En las masas inoculadas con yoghurt se observó un aumento en el contenido de humedad, mientras que en las masas sin inóculo e inoculadas con una mezcla de *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol el contenido de humedad disminuyó, principalmente en las primeras.

3.4.5. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque

Este efecto sólo se evaluó en el sustrato de harina de maíz nixtamalizado, corroborándose los resultados en los experimentos previos, donde se observó que hay un mayor incremento en el contenido de proteína cuando las muestras se cubren con hule espuma que cuando se cubren con película plástica impermeable a gases (de 15.2 a 26.27% y de 16.2 a 23.87%, respectivamente) (Figura 3.19). El contenido de acidez titulable fue mayor en tubos cubiertos con película plástica (0.71%) que con hule espuma (0.51%), el pH disminuyó más (de 6 a 3.8) cubriendo los tubos con película plástica y el contenido de humedad aumentó un poco más cubriéndolos con hule espuma (de 94.48 a 96.82%).

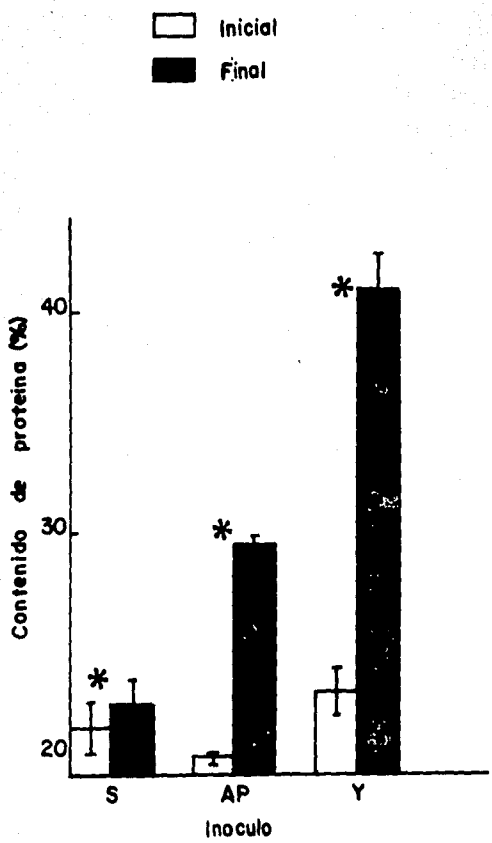


Figura 3.18. Efecto de la inoculación sobre el contenido final de proteína en la fermentación de maíz nixtamalizado TC 85 AR, suplementado con caseína. S = sin inóculo; AP = flora mixta de pozol (P) + *Agrobacterium azotophilum* (A); Y = yoghurt. (*) masas de forma esférica.

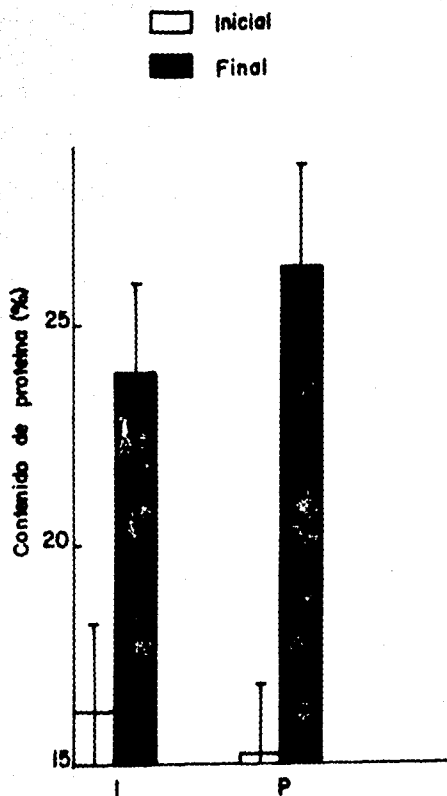


Figura 3.19. Efecto de la permeabilidad gaseosa del empaque sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína. Los tubos fueron cubiertos con película plástica impermeable a gases (I) o con hule espuma (P).

3.4.6. Efecto de la nixtamalización

Este aspecto fue evaluado preparando sustratos de maíz mejorado TC 85 AR y de sorgo con diferentes grados de nixtamalización. En los sustratos de maíz se pudo observar que el aumento en el contenido de proteína tiene una relación directa con el grado de nixtamalización del maíz (tiempo de cocción y de remojo). Las muestras totalmente nixtamalizadas presentaron un incremento de 19.06 a 34.22% de proteína, mientras que las muestras sometidas a cocción y remojo pero sin adición de cal alcanzaron un incremento de 20.5 a 29.65% y las muestras con 2/3 y 1/3 de nixtamalización presentaron valores similares (de 21.47 a 31.09% y de 20.66 a 30%, respectivamente) (Figura 3.20). El mayor aumento en el contenido de acidez titulable lo presentaron las muestras con 1/3 y 2/3 de nixtamalización (de 0.02 a 0.7% y de 0.02 a 0.69%, respectivamente), mientras que las muestras sometidas a cocción presentaron el menor aumento (de 0.02 a 0.52%). Todas las muestras alcanzaron un valor de pH muy similar (entre 3.83 y 3.9). También alcanzaron valores similares en el contenido de humedad (entre 97.60 y 97.96%).

En los sustratos de sorgo al mismo tiempo que se estudiaba el posible efecto de la nixtamalización, se observó el efecto del contenido de taninos, con diferentes tipos de sorgo. En el sustrato de sorgo con bajo contenido de taninos se observó también un mayor incremento en el contenido de proteína en las muestras nixtamalizadas que en las cocidas (de 12.13 a 19.67% y de 13.8 a 16.81%, respectivamente) (Figura 3.21). Las muestras con sorgo nixtamalizado de alto contenido de taninos presentaron aumentos en el con-

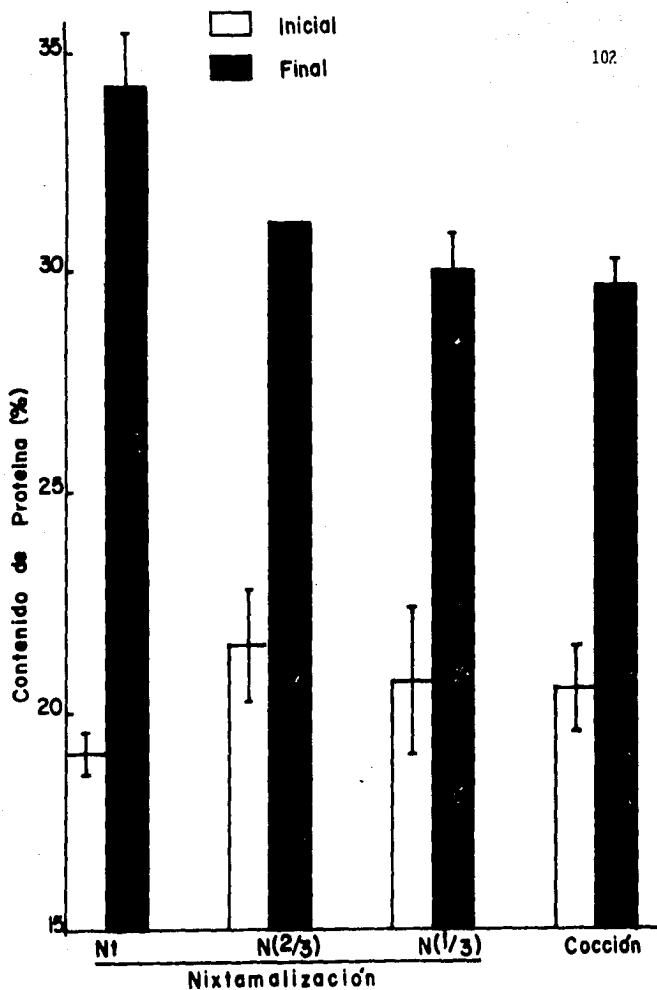


Figura 3.20. Efecto de la nixtamalización sobre el contenido final de proteína en la fermentación de maíz mejorado TC 85 AR, suplementado con caseína. Nt = totalmente nixtamalizado; N(2/3) = 2/3 de tiempo de nixtamalización; N(1/3) = 1/3 de tiempo de nixtamalización.

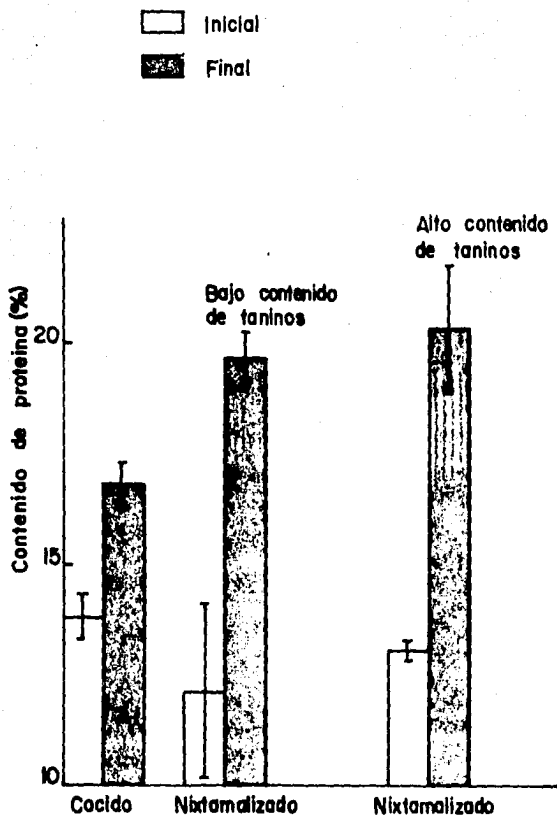


Figura 3.21. Efecto de la nixtamalización y del contenido de taninos sobre el contenido final de proteína en la fermentación de sorgo, suplementado con caseína.

tenido de protefna muy semejantes a los obtenidos con sorgo de bajo contenido de taninos, pues aumentó de 13.07 a 20.4%. La acidez titulable alcanzó un incremento ligeramente mayor en las muestras con sorgo nixtamalizado de alto contenido de taninos que en las de sorgo cocido con bajo contenido de taninos (de 0.08 a 0.68 y de 0.05 a 0.59%, respectivamente), mientras que el sorgo nixtamalizado de bajo contenido de taninos presentó un incremento menor (de 0.02 a 0.45%). El valor del pH más bajo alcanzado fue de 3.7 y lo presentaron las muestras cocidas sin cal. Las muestras nixtamalizadas con alto y bajo contenido de taninos alcanzaron valores similares (4 y 4.1, respectivamente). En relación al contenido de humedad, todas las muestras presentaron un ligero aumento, sobretodo las nixtamalizadas con bajo contenido de taninos.

3.4.7. Fermentación de sustratos de almidón y de éste con gluten de maíz

Con los principales componentes del maíz, almidón y gluten, se preparó un sustrato equivalente a la harina de maíz nixtamalizado, pero sin que estos componentes hayan estado sometidos al tratamiento de nixtamalización. En la Figura 3.22 se comparan los cambios en el contenido proteico en los sustratos de harina de maíz nixtamalizado, de almidón y de almidón con un 8% de gluten, todos ellos suplementados con casefna hasta aproximadamente un 15% de contenido inicial de protefna. En las muestras con harina de maíz nixtamalizado y con la mezcla almidón-gluten se produjeron incrementos similares en el contenido de protefna (de 16.2 a 23.87% y de 15.7 a 24.4%, respectivamente), superiores al encontrado en las muestras conteniendo exclu-

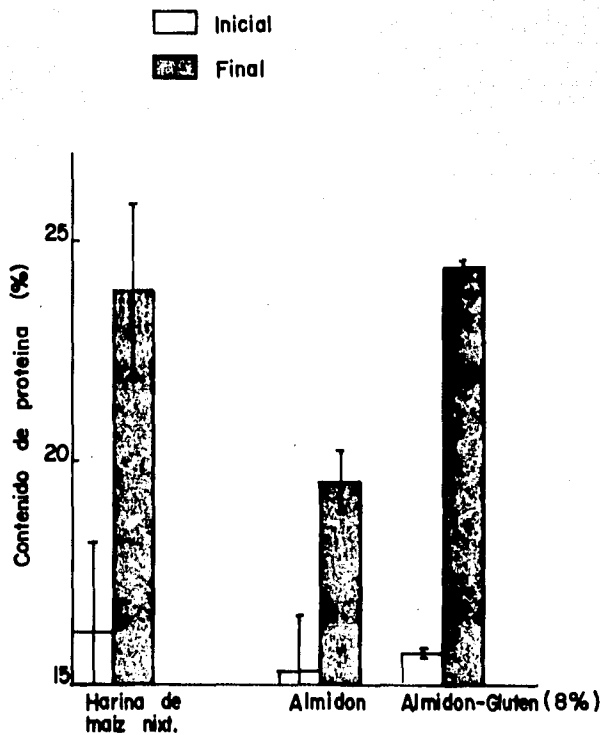


Figura 3.22. Efecto de la sustitución de harina de maíz nixtamalizado por almidón y almidón con gluten sobre el contenido final de proteína, suplementados con caseína.

sivamente almidón (de 15.27 a 19.6%). El aumento en el contenido de acidez titulable fue notablemente mayor en las muestras de harina de maíz nixtamalizado (de 0.05 a 0.71%), mientras que en las muestras de almidón y de almidón con gluten el aumento fue muy pequeño (de 0.05 a 0.14% y de 0.08 a 0.19%). También el valor del pH más bajo lo presentaron las muestras de harina de maíz nixtamalizado (3.8), aunque los valores alcanzados por los 3 tipos de muestra fueron muy semejantes (entre 3.8 y 4.17). El aumento en el contenido de humedad fue muy similar en las muestras con harina de maíz nixtamalizado y en las muestras con almidón y gluten (de 94.75 a 96.26% y de 94.41 a 96.61%), mientras que en las muestras de almidón el aumento fue muy pequeño (de 94.61 a 94.99%).

3.4.8. Fermentación de sustratos preparados con harina de maíz nixtamalizado y plátano

Se prepararon mezclas de estos dos materiales a diferentes proporciones, las cuales fueron suplementadas con urea o caseína hasta valores de aproximadamente un 15% de contenido de proteína inicial. Además se prepararon sustratos de plátano solo, suplementados con caseína. En los sustratos suplementados con urea, se observó que la adición de plátano presenta un efecto negativo en el incremento de proteína, puesto que las muestras de plátano con harina de maíz nixtamalizado en una proporción 2:1 presentaron un incremento insignificante (de 14.53 a 14.8%), mientras que en la proporción inversa (1:2) el incremento fue de 14.2 a 20.93% y en las muestras sin plátano el aumento fue de 16.27 a 24.6% de proteína (Figura 3.23). La

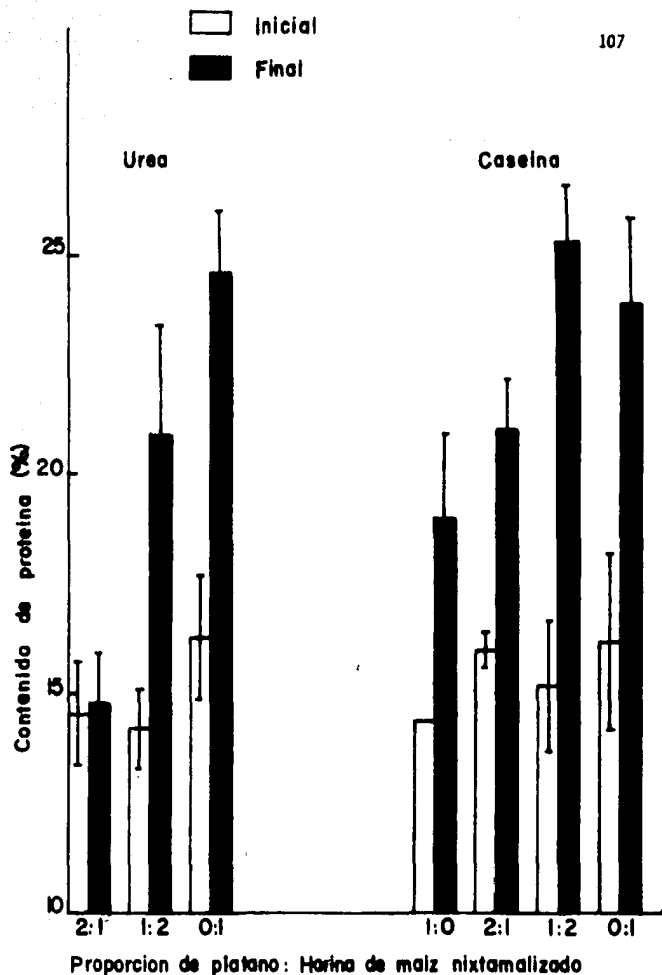


Figura 3.23. Efecto de la adición de plátano sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con urea o caseína.

acidez titulable aumentó más en las muestras sin adición de plátano (de 0.05 a 0.94%). El pH aumento en las muestras con plátano y harina de maíz nixtamalizado en una proporción 2:1 (de 5.2 a 5.77), mientras que en las muestras de harina de maíz con plátano en una proporción 2:1 y en las muestras sin plátano el pH disminuyó (de 5.8 a 4.83 y de 6.43 a 4.47, respectivamente). El contenido de humedad aumentó en todas las muestras pero el aumento fue ligeramente mayor en las muestras sin plátano (de 94.78 a 97.46%).

En las muestras suplementadas con caseína, la adición de plátano presentó un ligero efecto positivo (Figura 3.23). Las muestras que alcanzaron un mayor incremento en el contenido de proteína (de 15.2 a 25.33%) fueron las que contenían una parte de plátano por dos de harina de maíz nixtamalizado, mientras que las que presentaron menor incremento fueron las muestras de plátano sin harina de maíz (de 14.4 a 19%). Las muestras con una proporción de plátano: harina de maíz nixtamalizado de 2:1 alcanzaron un incremento mayor (de 16.0 a 21.07%) que las muestras de plátano, pero menor que las muestras de harina de maíz nixtamalizado sin plátano (de 16.2 a 23.87%). La acidez titulable disminuyó en las muestras de plátano solo, y en las mezclas con harina de maíz nixtamalizado se presentó un aumento que fue mayor conforme la cantidad de plátano adicionada disminuyó. El valor del pH también aumentó en las muestras de plátano (de 4.9 a 6.73), disminuyendo en las demás, especialmente en las muestras sin plátano. El contenido de humedad aumentó en todas las muestras, excepto en la que la proporción plátano-harina de maíz nixtamalizado era de 1:2, en donde disminuyó ligeramente

(de 94.77 a 94.43%).

3.4.9. Fermentación de sustratos preparados con harina de maíz nixtamalizado y col

Se prepararon mezclas con estos dos materiales, de manera similar al experimento anterior, suplementándolos con urea o caseína. En los sustratos suplementados con urea hubo un notable efecto positivo con la adición de col. En las muestras con una proporción col-harina de maíz nixtamalizado de 1:2 la proteína se incrementó de 15 a 30.93%, mucho más que en las muestras con una proporción mayor de col (2:1) y que en las muestras sin col (de 15 a 19.93% y de 16.27 a 24.6%, respectivamente) (Figura 3.24). A menor cantidad de col presente en las muestras, mayor fue el aumento en la acidez titulable. El valor del pH más bajo lo presentaron las muestras de col-harina de maíz nixtamalizado 1:2 (4.23). En todos los casos, el contenido de humedad aumentó, siendo mayor el aumento en las muestras sin col (de 94.78 a 97.46%) y menor en las que la relación col-harina de maíz nixtamalizado era de 2:1 (de 94.99 a 96.58%).

En los sustratos con caseína se observó el mismo efecto que con urea, obteniendo el más alto contenido de proteína en las muestras con una proporción col-harina de maíz nixtamalizado de 1:2 (de 15.73 a 30.93%), mientras que las muestras de col y de col con harina de maíz nixtamalizado (2:1) presentaron un contenido final de proteína menor (19.6% y 22.4%, respectivamente) que las muestras de harina de maíz nixtamalizado (23.87%) (Figura

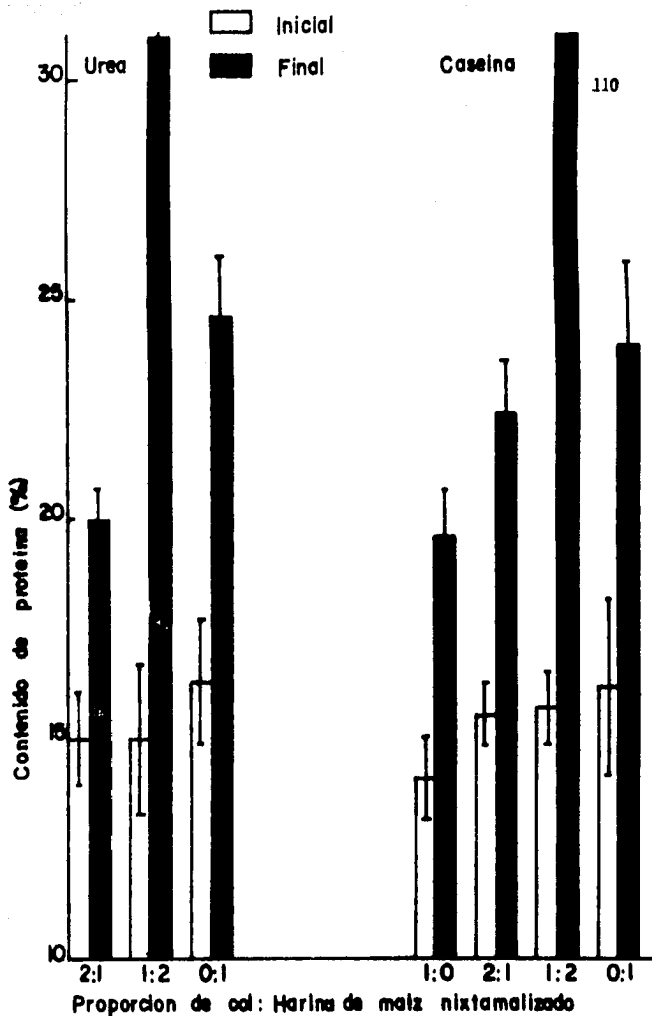


Figura 3.24. Efecto de la adición de col sobre el contenido final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con urea o caseína.

3.24). El mayor incremento en el contenido de acidez titulable lo presentaron las muestras con una proporción de col-harina de maíz nixtamalizado de 1:2 (de 0.09 a 0.83%), mientras que las muestras de col sin harina sólo presentaron un aumento de 0.22 a 0.39% de acidez titulable y las muestras sin col de 0.05 a 0.71%. El pH disminuyó más en las muestras sin col (de 6 a 3.8), quedando el valor del pH en un rango mayor conforme aumentó la cantidad de col presente en la muestra. Hubo un aumento en el contenido de humedad en todas las muestras, principalmente en las que la proporción col-harina de maíz nixtamalizado era de 1:2 (de 94.97 a 97.2%).

3.5. Balance de materia y nitrógeno

Para tratar de definir si los incrementos protéicos observados fueron resultado de una pérdida de materia orgánica debida a una fermentación aeróbica, o bien, el resultado de la fijación de nitrógeno, se requería de un balance neto de materia de los medios de fermentación que fueran más representativos. Para ello, se determinó su contenido inicial y final de cenizas. En la Tabla 3.22 se puede apreciar que el incremento neto en muchas de las muestras analizadas fue negativo, pues hubo un aumento en el contenido de cenizas con la fermentación. Tal fue el caso de la fermentación de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado, suplementado con urea e inoculado, o con caseína y sin inocular; lo mismo sucedió con el sorgo nixtamalizado, la mezcla de harina de maíz nixtamalizado con col, los sustratos de col y de plátano, de almidón y de almidón con gluten, y los medios de maíz nixtamalizado cubiertos con hule espuma, todos ellos con suplementación de caseína. Dicho balance fue positivo en el resto de las muestras, destacando el incremento neto en el contenido de proteína del medio de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado, que fue inoculado con yoghurt, el cual alcanzó un 187.40%.

Cuando los medios fueron suplementados con urea, aparentemente el aumento en el contenido de proteína fue similar que al suplementar con caseína, pero al determinar el incremento neto, se observó que, por el contrario, hubo un decremento.

TABLA 3.22

INCREMENTO NETO DE PROTEINA DE DIVERSOS MEDIOS COMPARATIVOS

Medio				Contenido de cenizas		Contenido de proteínas		Proteína Cenizas	Pérdida de materia orgánica (%)	Incremento n eto de proteí- na (%)
Fuente de carbo- no nixtamalizado	Contenido inicial de proteína	Tipo de medio	Inóculo	inicial (%)	final (%)	inicial (%)	final (%)			
Harina de maíz	15-16	S.d.	AP	1.46 ± 0.08	1.82 ± 0.00	16.20 ± 2.03	23.87 ± 1.97	2.01	19	18.21
Harina de maíz	22	S.d.	AP	1.50 ± 0.02	1.87 ± 0.29	22.43 ± 0.00	37.88 ± 1.95	1.13	19	35.36
Harina de maíz	14-16	S.d.	--	1.32 ± 0.18	1.96 ± 0.02	15.87 ± 0.83	30.87 ± 2.95	2.33	32	31.03
Harina de maíz	16	M.e.	AP	2.46 ± 0.11	1.16 ± 0.01	15.88 ± 1.61	19.64 ± 1.51	6.05	-20	55.61
Harina de maíz*	15-16	S.d.	AP	1.31 ± 0.09	3.45 ± 0.22	15.20 ± 1.56	26.27 ± 2.27	-3.99	62	-34.40
Harina de maíz-col	14-16	S.d.	AP	3.82 ± 0.38	8.29 ± 0.75	15.73 ± 0.81	30.93 ± 2.72	-0.39	54	-9.47
Maíz TC 85 AR	19-21	S.d.	AP	1.26 ± 0.02	1.44 ± 0.03	19.06 ± 0.48	34.22 ± 1.21	11.06	12	57.14
Maíz TC 85 AR	19-21	M.e.	AP	1.01 ± 0.01	0.99 ± 0.08	19.78 ± 0.24	29.41 ± 0.35	10.12	-2	51.68
Maíz TC 85 AR	21-23	M.e.	yoghurt	1.50 ± 0.02	0.94 ± 0.08	22.75 ± 1.11	40.96 ± 1.70	28.41	10	187.40
Maíz TC 85 AR	21-23	M.e.	--	2.83 ± 0.16	2.03 ± 0.18	21.22 ± 1.21	22.19 ± 1.21	-0.67	10	-45.78
Maíz TC 85 AR**	19	S.d.	AP	0.89 ± 0.07	3.11 ± 0.07	19.38 ± 0.28	37.11 ± 0.35	-9.84	71	-45.19
Maíz V-524	10	M.e.	AP	1.82 ± 0.02	1.61 ± 0.06	10.13 ± 1.40	13.51 ± 0.61	2.83	-13	50.89
Maíz "Tuxtepecito"	11	M.e.	AP	1.51 ± 0.09	2.25 ± 0.29	10.71 ± 1.01	15.98 ± 1.14	0.99	32	13.96
Sorgo	17	S.d.	AP	1.14 ± 0.32	2.24 ± 0.00	16.80 ± 1.44	24.29 ± 0.94	-3.90	49	-9.75
Sorgo	20	S.d.	AP	1.57 ± 0.07	2.55 ± 0.17	20.33 ± 1.40	29.40 ± 0.40	-1.42	38	-10.97
Plátano	14-16	S.d.	AP	3.01 ± 0.39	4.99 ± 0.41	14.40 ± 0.00	19.00 ± 1.93	-0.97	43	-20.29
Col	14-16	S.d.	AP	6.29 ± 0.37	30.55 ± 1.01	14.13 ± 0.92	19.60 ± 1.06	-0.39	40	-18.42
Almidón-gluten	15-16	S.d.	AP	1.14 ± 0.07	2.46 ± 0.22	15.70 ± 0.14	24.40 ± 0.20	-3.85	54	-27.96
Almidón	15-16	S.d.	AP	1.02 ± 0.01	1.33 ± 0.13	15.27 ± 1.29	19.60 ± 0.73	-0.23	23	-1.56

$$\text{Pérdida de materia orgánica (\%)} = 1 - \left(\frac{\% \text{ cenizas } t_0}{\% \text{ cenizas } t_f} \right) \times 100$$

$$\text{Incremento neto de proteína (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{g proteína}}{\text{g cenizas}} \right)_{t_f} - \left(\frac{\text{g proteína}}{\text{g cenizas}} \right)_{t_0}}{\left(\frac{\text{g proteína}}{\text{g cenizas}} \right)_{t_0}} \times 100$$

- * Sólo este medio fué cubierto con hule espuma, el resto se cubrieron con película plástica impermeable a gases
- ** Este medio fué suplementado con urea y todos los demás con caseína

Con el sustrato de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado y con harina de maíz nixtamalizado, suplementados con caseína, se había determinado un mayor incremento proteico en las suspensiones diluídas que en las masas de forma esférica. La comparación de los valores correspondientes del incremento neto de proteína demostró que esta diferencia es insignificante en el primer sustrato y contraria en el segundo.

Considerando los datos del incremento neto de proteína, existe una correlación directa entre el incremento neto proteico y la cantidad inicial de proteína en el medio.

Los medios de suspensiones diluídas no inoculados presentaron un incremento neto de proteína de casi el doble que los inoculados con *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol, mientras que en medios de masas de forma esférica no inoculados hubo un decremento.

Al adicionar col al medio de maíz nixtamalizado, el contenido neto de proteína disminuyó, aunque, aparentemente, había aumentado.

Se había determinado un mayor aumento en el contenido de proteína en los medios cubiertos con hule espuma que en los cubiertos con película plástica impermeable a gases, pero el incremento neto de proteína de los primeros resultó negativo.

En sustratos de almidón con gluten (8%), y de almidón solo, suplementados

con caseína, el contenido neto de proteína disminuyó, aunque ésta había aumentado aparentemente.

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el sustrato de almidón y caseína, que fue utilizado en la primera serie de experimentos conforme a un diseño experimental de acuerdo al método de Box-Wilson, se pretendía reproducir en el laboratorio la fermentación del pozol, con la intención de definir los parámetros de mayor influencia sobre el aumento en el contenido de proteína reportado en ésta. Sin embargo, no se produjo, con ninguna de las suplementaciones, una fermentación láctica similar a la del pozol, pues el pH aumentó en la mitad de los medios y en la otra mitad disminuyó de manera no significativa (Tabla 3.4). Es posible que esto fuera resultado de la baja concentración de carbohidratos solubles presentes en estos sustratos, lo que no permitió una producción adecuada de ácidos orgánicos (48). Como consecuencia, también se podría concluir que el cultivo de microflora mixta de pozol con que se inocularon los sustratos carece de microorganismos capaces de degradar almidón. Como resultado de ello, microorganismos indeseables, como *Clostridium*, tuvieron oportunidad de desarrollarse. Estos microorganismos convierten el ácido láctico en butírico, con lo que el pH del medio aumenta, y degradan proteína (48), lo que explicaría la disminución en su contenido; observado en estos experimentos (Tabla 3.3). En ningún caso se detectó aumento en el contenido de proteína, lo que podría deberse al escaso desarrollo del *Agrobacterium azotophilum* en sustratos de almidón, que Ulloa y Herrera (44) reportaron. El análisis de los resultados con el método de Box-Wilson no permitió definir los parámetros de mayor influencia en esta fermentación, ya que sus coeficientes fueron diferentes y, en algunos casos, de signo

contrario, para los dos tiempos de muestreo (Tabla 3.6). Era de esperarse que los coeficientes de los parámetros para la ecuación del pH y de la acidez titulable presentaran cierta correlación. Esta no se obtuvo y señala una posible inconsistencia en los resultados experimentales, o bien, que el descenso del pH puede estar sólo asociado a la capacidad amortiguadora del medio. Por otro lado, se obtuvieron unas desviaciones estándar muy grandes, que no fueron debidas a errores experimentales, pues simultáneamente se realizaron experimentos con harina de maíz nixtamalizado y las desviaciones fueron pequeñas (Tablas 3.3 y 3.4).

El análisis con el método de Box-Wilson de los resultados obtenidos con los sustratos de harina de maíz nixtamalizado permitió observar que el parámetro más influyente en el aumento en el contenido de proteína es el control del pH (Tabla 3.12), y dicha influencia fue negativa, por lo que se le debe permitir descender espontáneamente. La relación C/N presentó un coeficiente positivo para la evolución del contenido de proteína, indicando que la fijación de nitrógeno se favoreció con un contenido inicial alto de éste. Sin embargo, dicho coeficiente fue negativo para la evolución del pH y de la acidez titulable, lo que significa que la fermentación láctica se favorece con una relación C/N de 65.1, lo cual no concuerda con lo observado por Viniegra-González (49), que afirma que una relación C/N mayor a 30 favorece la fermentación alcohólica.

Con el objeto de determinar si el mayor contenido de proteína de los pozos con cacao, observado por Martínez (19), se debía a la proteína de

éste o a la grasa, se estudiaron los efectos de la adición de cocoa y de aceite de maíz. La primera presentó una influencia negativa, mientras que los medios con mayor contenido de aceite de maíz presentaron un aumento mayor en el contenido de proteína, lo que indica, que, aparentemente, la grasa es un factor importante en este proceso. El coeficiente de la adición de cocoa fue, por el contrario, positivo para la evolución del pH y de la acidez titulable, por lo que influye positivamente en la fermentación láctica. El coeficiente de la adición del aceite de maíz, para estos parámetros de evaluación, fue negativo a la semana de fermentación y positivo a las dos semanas, por lo que no se puede concluir si influye favorable o desfavorablemente.

Con este sustrato sí se presentó fermentación láctica en casi todas las suplementaciones, pues el pH disminuyó, excepto en aquéllos en que éste fue controlado y también hubo aumento en el contenido de proteína. No obstante, solamente en el medio con una relación C/N de 13.25 y sin control de pH el aumento fue mayor que en el medio control, con harina de maíz nix tamalizada exclusivamente y sin control de pH. En este grupo de experimentos tampoco hubo similitud en los coeficientes de los parámetros a la semana y a las dos semanas de fermentación, ni existió correlación alguna entre los de las ecuaciones del pH y de la acidez titulable. En vista de la ineficacia de este procedimiento se decidió estudiar, en el siguiente grupo de experimentos, la influencia de los parámetros de forma individual. La influencia del control del pH ya no fue considerada, dado que se observó notable y reiteradamente que es negativa.

De las diferentes variables estudiadas individualmente, los resultados más consistentes y a la vez bastante sorprendentes, se obtuvieron al analizar el efecto del contenido inicial de proteína. Tanto con sustratos de harina de maíz nixtamalizado suplementados con caseína o urea (Tablas 3.14, 3.17 y 3.20) (Figuras 3.1, 3.6, 3.12 y 3.13), como de sorgo nixtamalizado suplementado con caseína (Tabla 3.20) (Figura 3.13), el aumento en el contenido de proteína estuvo en función directa con el contenido inicial de nitrógeno, a mayor nivel inicial, mayor fue el contenido final de proteína, lo que puede indicar que los microorganismos fijadores de nitrógeno del pozol se desarrollan mejor con una cantidad considerable de nitrógeno en el medio. Este resultado fue corroborado al hacer el balance de materia y nitrógeno (Tabla 3.22).

En la Figura 4.1 se presenta una gráfica de la relación entre el contenido inicial y final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementado con caseína o con almidón. Se pudo observar que cuando la harina se suplementó con caseína, cuanto mayor fue el contenido inicial, mayor fue el final. En sustratos de harina de maíz nixtamalizado, suplementados con almidón el incremento en el contenido de proteína fue muy pequeño.

Al suplementar sustratos de harina de maíz nixtamalizado en suspensiones diluidas (Tablas: 3.14, 3.17 y 3.20) (Figuras 3.2, 3.7 y 3.13), con diversas fuentes de nitrógeno, proteicas e inorgánicas, se observó que con caseína, harina de soya, peptona de soya y urea se obtuvo un aumento en el

- △ Harina de maíz nixtamalizada
- Harina de maíz nixt. con caseína
- Harina de maíz nixt. con almidón

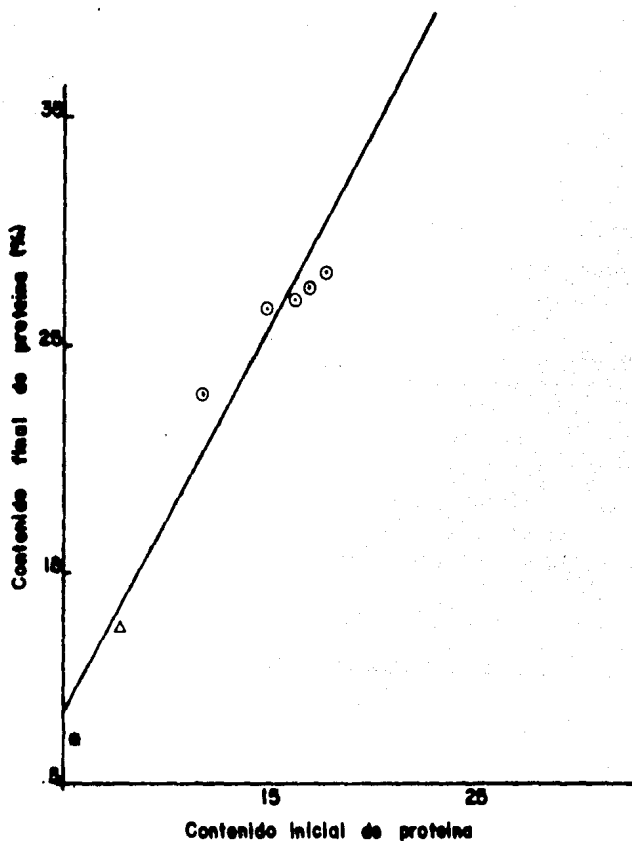


Figura 4.1. Relación entre el contenido inicial y el final de proteína en la fermentación de harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína o almidón.

contenido de proteína muy similar y notablemente mayor que con gallinaza, cocoa y sulfato de amonio, siendo el aumento ligeramente mayor con urea que con caseína. Al determinar el incremento neto de proteína, por medio del balance de materia, (Tabla 3.22) se pudo observar que con urea no existe tal incremento sino un decremento. Esto concuerda con la observación de Gómez (11), de que para la fermentación láctica espontánea, la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo incrementa la velocidad de crecimiento microbiano y de éste depende la formación del producto metabólico, y se puede observar que cuando no hay fermentación láctica, tampoco se presenta fijación de nitrógeno, ya que cuando el pH aumenta, el contenido neto de proteína disminuye; además, fuentes de nitrógeno con alto contenido de amoníaco o producción de éste inhiben a la nitrogenasa de los microorganismos, enzima responsable de la fijación de nitrógeno (31).

Los resultados observados en sustratos de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado (Tabla 3.20) (Figura 3.14) en suspensiones diluidas, suplementadas con caseína y con urea, coinciden con los observados con harina de maíz nixtamalizado, pues con urea el aumento en el contenido de proteína fue ligeramente mayor que con caseína, lo que también resultó falso al hacer el balance de materia (Tabla 3.22). Sin embargo, la fermentación de este sustrato en masas de forma esférica presentó un contenido proteínico notablemente mayor con caseína que con urea. En sustratos de sorgo nixtamalizado (Tabla 3.20) (Figura 3.15) se obtuvieron contenidos de proteína final muy similar con ambas fuentes de nitrógeno.

Comparando los aumentos en el contenido de proteína obtenidos con los sustratos de harina de maíz nixtamalizado, almidón con gluten y de almidón (Tabla 3.20) (Figura 3.22), todos suplementados con caseína, se observó que los de los dos primeros fueron muy similares y mucho mayores que el aumento en el sustrato de almidón sin gluten, pero al determinar el contenido neto de proteína, se observó que, por el contrario, hay un decremento en dicho contenido, al igual que en los medios de almidón con caseína, lo que podría señalar que en almidón industrializado no se produce fijación de nitrógeno.

Para definir el efecto de la fuente de grasa sobre la fijación de nitrógeno, se suplementaron sustratos de harina de maíz nixtamalizado con aceite de maíz (Tabla 3.14) (Figuras 3.4 y 3.5) y con manteca de cacao (Figura 3.5). Se observó un mayor aumento en el contenido de proteína al añadir el aceite de maíz que con manteca de cacao, aunque la adición de grasa no favoreció el aumento en el contenido de proteína, afectándola incluso de manera negativa. Este resultado no concuerda con el obtenido en los experimentos iniciales, el cual indicaba que este parámetro podía influir positivamente sobre el proceso de fijación de nitrógeno.

Al adicionar cocoa al sustrato de harina de maíz nixtamalizado (Tabla 3.14) (Figura 3.5) se observó un ligero efecto positivo, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Martínez (19) y contradicen la influencia negativa observada con el método de Box-Wilson en los experimentos iniciales. Esto se podría deber a su alto contenido de calcio (15).

Al cubrir los medios de fermentación con hule espuma, el contenido de proteína aumentó más que al cubrirlos con película plástica impermeable a gases, pero el contenido de proteína neto disminuyó, lo que sugiere que para que se presente fijación de nitrógeno se requiere de anaerobiosis. Se sabe que la nitrogenasa presenta una gran sensibilidad frente al oxígeno y esta enzima puede funcionar en las bacterias aerobias merced a dos mecanismos protectores (31), por lo que el aparente aumento en el contenido de proteína pudo ser debido a una fermentación aerobia, y no, a la fijación de nitrógeno (Tablas 3.17, 3.20 y 3.22) (Figuras 3.8 y 3.19).

Al estudiar el incremento protéico en diferentes medios de fermentación, con sustratos de harina de maíz nixtamalizado y de maíz mejorado V-524 (Tabla 3.17) (Figuras 3.9 y 3.10), se observó que fue mayor en suspensiones diluidas que en suspensiones concentradas y que en masas de forma esférica, cuyo incremento fue similar. Sin embargo, cuando se utilizó maíz criollo "Tuxpeñito" (Figura 3.11) se obtuvo mayor incremento de proteína en las masas de forma esférica, resultado que no concuerda con los obtenidos en los otros tipos de maíz, pues con el maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado también se observó un mayor incremento de proteína en las suspensiones diluidas que en las masas de forma esférica. Al realizar el balance de materia (Tabla 3.22), se pudo observar que el maíz mejorado TC 85 AR presenta un contenido neto de proteína muy similar en las suspensiones diluidas y en las masas de forma esférica, y en sustratos de maíz nixtamalizado, el incremento neto es mucho mayor en las masas que en las suspensiones diluidas. Este resultado es más coherente, pues en las suspensiones diluidas la fer-

mentación fue aeróbica, lo que se pudo observar en el hecho de que el contenido de humedad aumentó, debido a que en este tipo de fermentación se produce agua y, además, CO_2 .

La temperatura de incubación que presentó mejores resultados fue de 28°C , ya que el aumento en el contenido de proteína fue mayor que al incubarlos a 35 y 45°C , debido probablemente a que la temperatura óptima de crecimiento del *Agrobacterium azotophilum* es en un rango de 25 a 30°C (44) (Tabla 3.20) (Figura 3.16).

El efecto producido por la inoculación con *Agrobacterium azotophilum* fue contrario a lo esperado. Con los sustratos de harina de maíz nixtamalizado en suspensiones diluídas el efecto fue negativo, pues en las suspensiones no inoculadas el aumento en el contenido de proteína fue aproximadamente el doble; el menor aumento se obtuvo al inocular con *Agrobacterium azotophilum*, mientras que el cultivo mixto de pozol produjo un mayor incremento que la inoculación con una mezcla de ambos (Tabla 3.20) (Figura 3.17). Este resultado fue corroborado al hacer el balance de materia (Tabla 3.22). Esto puede indicar que la microflora natural del pozol presenta un balance de población óptimo para la fermentación y la fijación de nitrógeno. Con un sustrato de maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado en masas de forma esférica se observó que al inocular con yoghurt, el aumento en el contenido de proteína es mucho mayor que al utilizar una mezcla de *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol, mientras que cuando la fermentación es espontánea el aumento es muy pequeño e inclusive, al realizar el balance de

materia se observó que hay un decremento (Tablas 3.20 y 3.22) (Figura 3.18). La probable explicación de esto radica en la acción de los *Lactobacillus* del yoghurt. Por otro lado, cuando los medios de fermentación se preparan como suspensiones diluidas no hay crecimiento de hongos, mientras que en la superficie de las masas se observó proliferación de éstos, lo que podría explicar que en este caso sea conveniente inocular los medios y no permitir que fermenten espontáneamente.

Fue posible determinar un efecto positivo de la nixtamalización sobre el aumento en el contenido de proteína. A medida que los sustratos de maíz mejorado TC 85 AR y de sorgo tuvieron un grado de nixtamalización mayor, el aumento en el contenido de proteína fue también mayor (Tabla 3.22) (Figuras 3.20 y 3.21). Durante la nixtamalización se modifican principalmente las proporciones entre aminoácidos y entre éstos y el nitrógeno total, haciendo a las proteínas más digeribles. Además, se libera niacina, debido a que se hidrolizan enlaces, haciéndola más disponible y la digestibilidad de la zeína disminuye (40), lo que podría influir en el desarrollo de microorganismos fijadores de nitrógeno. Otro posible factor importante de la nixtamalización sería el contenido de calcio. En el caso del sorgo el contenido de taninos no presentó una influencia apreciable sobre el aumento en el contenido de proteína, lo que sugiere que durante la fermentación las sustancias que forman complejos con las proteínas son destruidas. Se observó que en medios de sorgo el contenido de cenizas aumenta con la fermentación (Tabla 3.22), lo que significa que hay una pérdida de materia orgánica y, por lo tanto, el aumento en el contenido de proteína es debido

a la fermentación aerobia y no a la fijación de nitrógeno.

El efecto de la adición de plátano a sustratos de maíz nixtamalizado, suplementados con urea, sobre la fijación de nitrógeno fue negativo, mientras que al suplementar con caseína este efecto fue ligeramente positivo, cuando la cantidad de plátano añadida fue pequeña (plátano (1):harina (2)). Lo mismo ocurrió al adicionar col en la misma proporción (Tabla 3.20) (Figuras 3.23 y 3.24). Este efecto positivo fue desmentido al realizar el análisis de cenizas (Tabla 3.22), pues se observó que el contenido neto de proteína disminuyó, por lo que el aumento observado se debe a una fermentación aerobia. Con sustratos de plátano con caseína y de col con caseína el aumento en el contenido de proteína fue menor que en sustratos de harina de maíz nixtamalizado, también con caseína, lo que indica que los microorganismos del pozol necesitan al maíz como sustrato. Además, los dos sustratos presentaron una pérdida de materia orgánica y un decremento en el contenido neto de proteína (Tabla 3.22).

Comparando tres fuentes de maíz (harina de maíz, maíz mejorado V-524 y maíz criollo "Tuxpeñito", todos nixtamalizados) en suspensiones diluidas se observó que el incremento en el contenido de proteína fue mayor en sustratos de harina, mientras que con las otras fuentes el incremento fue ligeramente mayor con maíz mejorado V-524. Lo mismo se observó en medios de suspensiones concentradas, aunque, en este caso y cuando la fermentación se llevó a cabo en masas de forma esférica, el contenido inicial de proteína fue mayor en los medios de harina, por lo que no permite obtener conclusio

nes definitivas de dicha comparación. En masas de forma esférica este sustrato también presentó un mayor incremento en el contenido de proteína, pero con el maíz criollo "Tuxpeñito" el aumento fue mayor que con el V-524 (Tabla 3.17) (Figuras 4.2, 4.3 y 4.4). Al realizar el balance de materia, comparando las diferentes fuentes de maíz nixtamalizado en masas de forma esférica, los sustratos con maíces mejorados V-524 y TC 85 AR presentaron un incremento de proteína mayor, aunque la diferencia con la harina no fue muy grande, pero sí fue notable con el maíz criollo "Tuxpeñito" (Tabla 3.22), lo que sugiere que la composición química del maíz influye sobre la fijación de nitrógeno.

También comparando los aumentos en el contenido de proteína de diferentes sustratos amiláceos, suplementados con caseína, se observó que el mayor aumento lo presentaron los de harina de maíz nixtamalizado con col (2:1). Los de harina sola, ésta con plátano (2:1), almidón con gluten y sorgo nixtamalizado alcanzaron aumentos intermedios, mientras que el de los sustratos de col, plátano, almidón y maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado fueron los menores (Tabla 3.20) (Figura 4.5), pero al hacer el balance de materia se observó que sólo en los sustratos de maíz TC 85 AR y de harina de maíz, nixtamalizados, hubo un aumento en el contenido neto de proteína (Tabla 3.22).

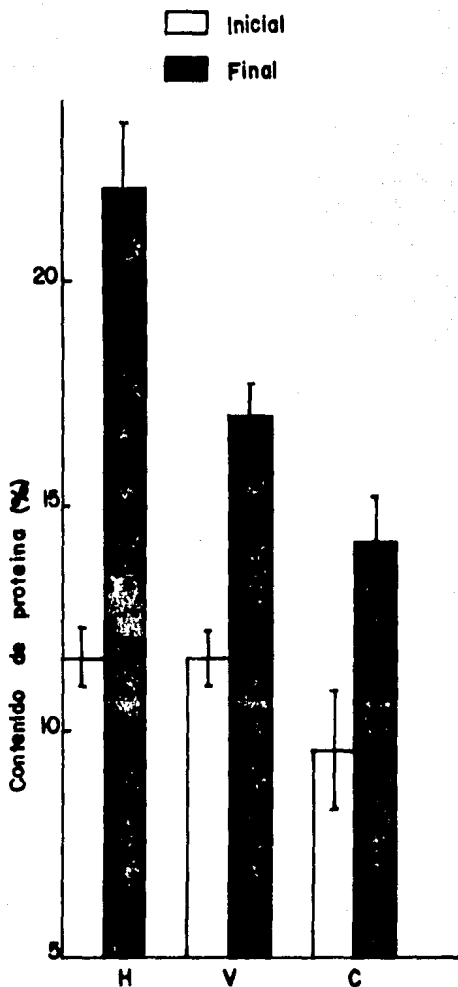


Figura 4.2. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de tres diferentes tipos de maíz nixtamalizado. H = harina de maíz nixtamalizado industrializado, suplementada con caseína; V = maíz mejorado V-524; C = maíz criollo "Tuxpeño". La fermentación se llevó a cabo en suspensiones diluídas (Humedad = 93-95%, en tubos).

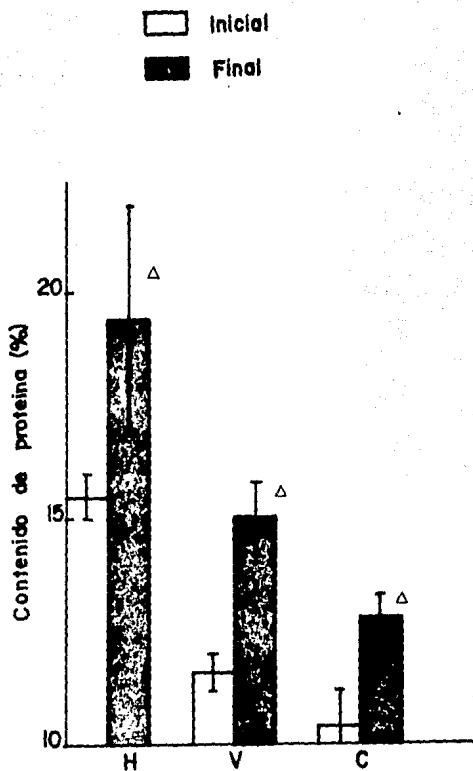


Figura 4.3. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de tres diferentes tipos de maíz nixtamalizado. H = harina de maíz nixtamalizado, suplementada con caseína; V = maíz mejorado V-524; C = maíz criollo "Tuxpeño". (Δ) La fermentación se realizó en suspensiones concentradas (Humedad = 80-85%, en matraces).

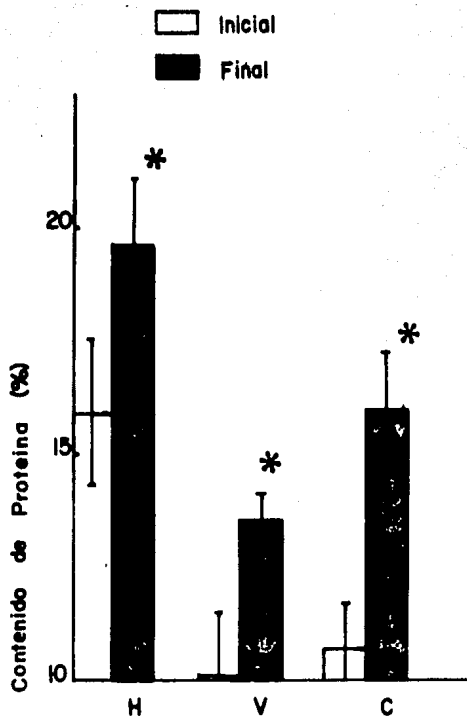


Figura 4.4. Aumento en el contenido de proteína en la fermentación de tres diferentes tipos de maíz nixtamalizado. H = harina de maíz nixtamalizado industrializada, suplementada con caseína; V = maíz mejorado V-524; C = maíz criollo "Tuxpeñito". * La fermentación se realizó empacando la masa nixtamalizada (Humedad = 50-60%) en forma esférica.

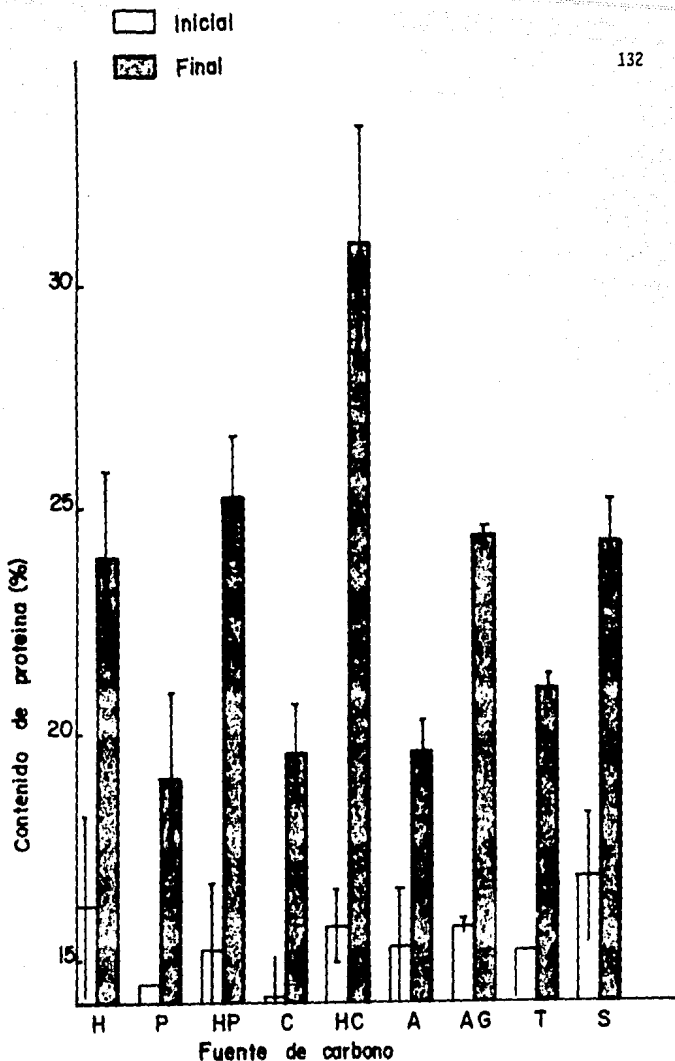


Figura 4.5. Cambio en el contenido de proteína en la fermentación de distintas fuentes de carbono, suplementadas con caseína. H = harina de maíz nixtamalizado; P = plátano; HP = H + P (2:1); C = col; HC = H + C (2:1); A = almidón; AG = A + gluten (5%); T = maíz TC 85 AR nixt.; S = sorgo nixt.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en los diversos experimentos realizados, permiten obtener las siguientes conclusiones:

- En medios de almidón industrializado no se presenta aumento en el contenido de proteína, por no haber suficiente cantidad de carbohidratos solubles
- La temperatura óptima de incubación para el aumento en el contenido de proteína en el pozol, entre las tres estudiadas es de 28°C
- La regulación del pH a 6.5 no favorece el aumento en el contenido de proteína, pues no se permite la formación de mayores cantidades de ácido láctico
- Sólo se determinó fijación de nitrógeno cuando se presentó fermentación láctica
- Una relación C/N pequeña (13.25) favorece el aumento en el contenido de proteína
- Los medios deben ser cubiertos con película plástica impermeable a gases para que se presente fijación de nitrógeno con los microorganismos del pozol, ya que la nitrogenasa es muy sensible al oxígeno

- El aumento en el contenido de proteína en medios suplementados con caseína esta en relación directa con el contenido inicial de ésta
- Es muy importante efectuar un balance de materia y nitrógeno para definir si el aumento en el contenido de proteína se debe a la fijación de nitrógeno o a una fermentación aerobia
- En medios suplementados con urea disminuye el contenido neto de proteína
- En sustratos de maíz mejorado nixtamalizado TC 85 AR la diferencia en los incrementos netos de proteína de suspensiones diluídas y masas de forma esférica es insignificante y este incremento es mucho mayor en éstas que en suspensiones diluídas en sustratos de harina de maíz nixtamalizado industrializada
- El gluten de maíz sin nixtamalizar es un factor negativo en el aumento en el contenido de proteína, debido a la falta de los efectos que produce la nixtamalización
- El grado de nixtamalización esta en relación directa con el aumento en el contenido de proteína
- Entre todos los medios estudiados, solo se presentó aumento en el contenido de proteína debida a microorganismos del pozol en el maíz nixtamalizado

- En medios de suspensiones diluidas es preferible permitir el desarrollo de la microflora propia del maíz que inocular
- En medios de masas de forma esférica es mejor inocular que permitir la proliferación de la flora natural
- En medios de suspensiones diluidas la inoculación con *Agrobacterium azotophilum* es menos conveniente que la inoculación con flora mixta de pozol
- Se obtuvo un producto con un incremento neto de proteína del 187% con maíz mejorado TC 85 AR nixtamalizado, suplementado con caseína e inoculado con yoghurt

Para continuar el presente estudio, se recomienda analizar los siguientes aspectos:

- Definir la bioquímica de la fermentación del pozol, por medio de la determinación de los metabolitos producidos (AGV, alcohol, etc.)
- Determinar el valor nutritivo de los productos obtenidos (PER y digestibilidad)
- Determinar los cambios en el contenido de aminoácidos durante la fermentación por medio de aminogramas

- Determinar los contenidos de nitrógeno a tiempos intermedios, para definir el óptimo
- Estudiar la microflora natural en relación con la bioquímica, cuantificando los microorganismos en cada paso de la fermentación y clasificarlos, a diferentes contenidos iniciales de nitrógeno

Los parámetros que convendría seguir estudiando, debido a su probable influencia sobre éste proceso, son:

- Valores de pH iniciales diferentes
- Distintos tamaños de masas de forma esférica
- Diferentes concentraciones de calcio, para determinar si lo que influye de la nixtamalización es el contenido de éste o los cambios debidos a dicho proceso

CAPITULO VI

BIBLIOGRÁFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Akingbala, J., Rooney, L. W. y Faubion, J. M., 1981. PHYSICAL, CHEMICAL AND SENSORY EVALUATION OF OGI FROM SORGHUM OF DIFFERING KERNEL CHARACTERISTICS. J. Food Sci. 46: 1532-1536.
2. Amoa, B. y Muller, H.G., 1976. STUDIES ON KENKEY WITH PARTICULAR REFERENCE TO CALCIUM AND PHYTIC ACID. Cereal Chem. 53(3): 365-375.
3. Association of Official Analytical Chemists, 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 13th Ed. A.O.A.C., Inc. Arlington, Virginia, U.S.A. (Determinación de humedad), 211p.
4. Association of Official Analytical Chemists. 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 13th Ed. A.O.A.C., Inc. Arlington, Virginia, U.S.A. (Determinación de acidez titulable), 366p.
5. Association of Official Analytical Chemists, 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 13th Ed. A.O.A.C., Inc. Arlington, Virginia, U.S.A. (Determinación de proteína por el método de microkjeldahl), 220p.
6. Association of Official Analytical Chemists. 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 13 th Ed. A.O.A.C., Inc. Arlington, Virginia, U.S.A. (Determinación de cenizas), 211p.
7. Au, P. M. y Fields, M. L., 1981. NUTRITIVE QUALITY OF FERMENTED SORGHUM. J. Food Sci. 46: 652
8. Brown, W. V. y Collins, E. B., 1977. END PRODUCTS AND FERMENTED BALANCES FOR LACTIC *streptococci* GROWN AEROBICALLY ON LOW CONCENTRATIONS OF GLUCOSE. Appl. Environ Microbiol. 33: 38.
9. Cravioto, R. O., Cravioto, O. Y., Massieu H. y Guzmán, G., 1955. EL PO-

- ZOL, FORMA INDIGENA DE CONSUMIR MAIZ EN EL SURESTE DE MEXICO Y SU APORTE DE NUTRIENTES A LA DIETA. *Ciencia*, Méx. 15: 27-30
10. Gashe, B. A., 1985. INVOLVEMENT OF LACTIC ACID BACTERIA IN THE FERMEN-TATION OF TEF (*Eragrostis tef*), AND ETIOPIAN FERMENTED FOOD. *J. Food Sci.* 50: 800-801.
11. Gómez, H. J., 1983. ORIENTACION DE LAS FERMENTACIONES LACTICA Y ALCOHO-LICA EN CULTIVOS MIXTOS POR CAMBIOS AMBIENTALES. Tesis de maestría. Fac. de Química. Univ. Auton. Méx. México, D.F., 43p.
12. Gómez, H. J. y Viniegra-González, G., 1981. ORIENTATION OF SUGAR FERMEN-TATION INOCULATED WITH HETEROGENEOUS MICROBIAL POPULATION FROM COW-DUNG. *Adv. Biotechnol.* 2: 627-631.
13. Gregory, K. F., Reade, A. E., Santos-Núñez, J., Alexander, J. C., Smith, R. E. y Maclean, S. J. 1977. FURTHER THERMOTOLERANT FUNGI FOR THE CONVER-SION OF CASSAVA STARCH TO PROTEIN. *Animal Feed Sci. Technol.* 2: 7-19.
14. Hamad, A. H. y Fields, M. L., 1979. EVALUATION OF PROTEIN QUALITY AND A VAILABLE LYSINE OF GERMINATED CN FERMENTED CEREAL. *J. Food Sci.* 44: 456-459.
15. Hernández, M., Chávez, A. y Bourges, H., 1977. VALOR NUTRITIVO DE LOS A LIMENTOS MEXICANOS. Tablas de uso práctico. Inst. Nal. Nutrición. México, D. F., 20p.
16. Kazanas, N. y Fields, M. L., 1981. NUTRITIONAL IMPROVEMENT OF SORGHUM BY FERMENTACION. *J. Food Sci.* 46: 819.
17. Kent, M. A., 1971. TECNOLOGIA DE LOS CEREALES. 1a. Ed. Acribía. Zaragoza, España. 37p.
18. López, Y., Gordon, D. T. y Fields, M. L., 1983. RELEASE OF PHOSPHOROUS

- FROM PHYTATE BY NATURAL LACTIC ACID FERMENTATION. *J. Food Sci.* 48: 953.
19. Martínez, R., 1986. FERMENTACION ANAEROBIA DEL MAIZ. Tesis profesional. Esc. de Química, Univ. La Salle. México, D.F. en prensa.
20. Mitaru, N.B., Reichert, D.R. y Blair, R., 1984. KINETICS OF TANNIN DEACTIVATION DURING ANAEROBIC STORAGE AND BOILING TREATMENTS OF HIGH TANNING SORGHUMS. *J. Food Sci.* 49: 1566-1568.
21. Moon, H. J., 1979. OPTIMIZATION OF LACTIC ACID FERMENTATION OF FROZEN VEGETABLE PROCESS WASTES: MODEL SYSTEMS FOR PRODUCING ANIMAL FEEDS. *J. Food Sci.* 44: 1460-1465.
22. Muller, H. G., 1980. FERMENTED CEREAL PRODUCTS OF TROPICAL AFRICA. 6th Int. Symp. on Fermentation. London, England.
23. Murdock, F. A. y Fields, M. L., 1984. B-VITAMIN CONTENT OF NATURAL LACTIC ACID FERMENTED CORN MEAL. *J. Food Sci.* 49: 373-375.
24. Nanson, N. J. y Fields, M. L., 1982. EFFECT OF *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *pseudomonas maltophilia* SINGLY AND IN COMBINATION ON THE RELATIVE NUTRITIVE VALUE OF FERMENTED CORN MEAL. *J. Food Sci.* 47: 1294-1295.
25. Okafor, N., 1981. A SCHEME FOR THE IMPROVEMENT OF FERMENTED FOODS OF AFRICA SOUTH OF THE SAHARA. In proceedings of the Sixth International Conference on Global Impacts of Applied Microbiology (GIAM VI). Lagos, Nigeria. Emejuaiwe, S. O., Ogunbi, O. y Sanni, S. O. (Eds.). Academic Press, London, England. 45-49pp.
26. Pederson, C. S., 1978. MICROBIOLOGY OF FOOD FERMENTATIONS. 2nd Ed. AVI Publishing, Co., Inc. Westport, Connecticut, U.S.A. 86p.

27. Pederson, C. S., 1978. MICROBIOLOGY OF FOOD FERMENTATIONS. 2nd Ed. AVI Publishing, Co., Inc. Westport, Connecticut, U.S.A. 75-76pp.
28. Rimbault, M., 1982. METODO DE DISEÑO EXPERIMENTAL. Seminario de Biotecnología. Mecanografiado.
29. Rimbault, M. y Alazard, D., 1980. CULTURE METHOD TO STUDY FUNGAL GROWTH IN SOLID FERMENTATION. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 199-209.
30. Reddy, N. R. y Salunkhe, D. K., 1980. EFFECTS OF FERMENTATION ON PHYTATE PHOSPHORUS AND MINERAL CONTENT IN BLACK GRAM, RICE AND BLACK GRAM AND RICE BLENDS. J. Food Sci. 45: 1708-1712.
31. Rose, A. H., 1977. MICROBIOLOGIA QUÍMICA. 2a. Ed. Alhambra, Madrid, España. 307-313pp.
32. Saint-Phard, C. J., 1984. APROVECHAMIENTO DE LOS DESPERDICIOS DE PLÁTANO MADURO POR FERMENTACIÓN SÓLIDA, Tesis profesional. Fac. de Química, Univ. Nat. Auton. México, D.F. 9p.
33. Salinas Chapa, C., 1958. ETNOBIOLOGÍA E INTRODUCCIÓN A LA BACTERIOLOGÍA DEL POZOL. Tesis profesional. Fac. de Ciencias, Univ. Nat. Auton. México, D.F. 63p.
34. Senez, J. C., 1978. SOLID STATE FERMENTATION OF STARCHY SUBSTRATES. U. N. U., Intern. Conference. Guatemala, Guatemala. 127-131pp.
35. Steinkraus, K. H., 1983. HANDBOOK OF INDIGENOUS FERMENTED FOODS. Vol. 9 of Microbiology Series. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, U.S.A. 189-238pp.
36. Thomas, T. D., Ellwood, P. y Longyear, U. M., 1979. CHANGE FROM HOMO TO HETEROLACTIC FERMENTATION BY *Streptococcus lactis* RESULTING FROM GLUCOSE LIMITATION IN ANAEROBIC CHEMOSTAT CULTURES. J. Bacteriol. 138: 109.

37. Tongnual, P. y Fields, M. L., 1979. FERMENTATION AND RELATIVE NUTRITIVE VALUE OF RICE MEAL AND CHIPS. *J. Food Sci.* 44: 1784.
38. Tongnual, P. y Fields, M. L., 1984. EFFECTS OF HEAT AND FERMENTATION ON THE EXTRACTABILITY OF MINERALS FROM SOYBEAN MEAL AND CORN MEAL BLENDS. *J. Food Sci.* 49: 566-567.
39. Tongnual, P., Nanson, N. J. y Fields, M. L., 1981. EFFECT OF PROTEOLITIC BACTERIA IN THE NATURAL FERMENTATION OF CORN TO INCREASE ITS NUTRITIVE VALUE. *J. Food Sci.* 46: 100-104 y 109.
40. Tovar, L. R., 1981. EFFECTS OF TREATMENT WITH ALKALI ON THE NUTRITIONAL CHARACTERISTICS OF PROTEIN. Doctoral thesis. Univ. California, Berkeley, U.S.A.
41. Ueda, S., 1981. FUNGAL GLUCOAMYLASES AND RAW STARCH DIGESTION. Biomedical Press. Elsevier/North-Holland.
42. Ulloa, M., 1974. MYCOFLORAL SUCCESSION IN POZOL FROM TABASCO, MEXICO. *Biol. Soc. Méx. Mic.* 8: 17-48.
43. Ulloa, M., 1981. INDIGENOUS FERMENTED BEVERAGES OF MEXICO. Academic Press. Global Impacts of Applied Microbiology, Sixth International Conference.
44. Ulloa, M. y Herrera, T., 1972. DESCRIPCION DE DOS ESPECIES NUEVAS DE BACTERIAS AISLADAS DEL POZOL: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozoilis*. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 14: 15-24.
45. Ulloa, M. y Herrera, T., 1973. CARACTERISTICAS GENERALES Y ALGUNOS DATOS SOBRE PRUEBAS DE ANTIBIOTICIDAD DE CINCO ESPECIES DE *Penicillium* aisladas del pozol. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 15: 191-197.
46. Ulloa, M. y Herrera, T., 1982. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA

MICROBIOLOGIA DE BEBIDAS FERMENTADAS INDIGENAS DE MEXICO: POZOL, TESGUINO, PULQUE, COLONCHE Y TEPACHE. An. Inst. Biol. Univ. NaI. Autón. México 47-53, Ser. Botánica: 145-163.

47. Umoh, V. y Fields, M. L., 1981. FERMENTATION OF CORN FOR NIGERIAN AGIDI. J. Food Sci. 46: 903-905.

48. Viana, M. T., 1982. UNA ALTERNATIVA A LA UTILIZACION DE SUBPRODUCTOS DE LA FAUNA DE ACOMPAÑAMIENTO DEL CAMARON. COMPOSICION QUIMICA DE MICROENSILAJES DE SUBPRODUCTOS PESQUEROS Y DESPERDICIOS AGRICOLAS. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias, Univ. NaI. Autón. México, D.F. 53p.

49. Viniegra, G. y Gómez, J., 1982. LACTIC ACID PRODUCTION BY PURE AND MIXED BACTERIAL CULTURES. IN FUELS AND ORGANIC CHEMICAL FROM BIOMASS. D. Wise, CRC Press, New York, U.S.A.

50. Yildiz, F. y Westhoff, D., 1981. ASSOCIATIVE GROWTH OF LACTIC ACID BACTERIA IN CABBAGE JUICE. J. Food Sci. 46: 962-963.

51. Zamora, A. F. y Fields, M. L., 1979. NUTRITIVE QUALITY OF FERMENTED COW PEAS (*Vigna sinensis*) AND CHICKPEAS (*Cicer arietinum*). J. Food Sci. 44: 234-235 y 241.