

03072

1
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UACF Y P DEL CCH**



**ESTUDIO DEL EFECTO DE ALGUNOS
PARAMETROS SOBRE LA FERMENTACION
LACTICA Y LA FIJACION DE NITROGENO
EN EL POZOL.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA LA Q. F. B.
MARIA ELISA ISABEL ALVAREZ SUAREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	5
OBJETIVOS GENERALES	6
I. GENERALIDADES	7
1.1 POZOL	7
1.1.1 Preparación	7
1.1.2 Microbiología	7
1.1.3 Factores que influyen sobre la fijación de nitrógeno en el pozol	10
1.2 FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO	13
1.2.1 Fisiología	13
1.2.2 Nitrogenasa	14
1.2.3 Inhibidores de la fijación de nitrógeno	17
1.2.4 Efecto de factores externos en la fijación de nitró- geno	17
1.2.4.1 Nutrición mineral	18
1.2.4.2 Oxígeno	19
1.2.4.3 Nitrógeno combinado	20
1.2.4.4 Energía	21
1.2.5 Regulación genética	21
1.2.6 Comparación entre fijadores de nitrógeno de existen- cia libre y simbióticos	25
1.2.7 Crecimiento asociativo de bacterias fijadoras de ni- trógeno con otros microorganismos	26

II. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION	29
2.1 MICROORGANISMOS	30
2.2 MATERIAS PRIMAS	32
2.3 PREPARACION DE LAS MATERIAS PRIMAS PARA LOS MEDIOS DE FERMENTACION	33
2.3.1 Preparación de los granos de maíz y sorgo por nix- tamalización o cocción	33
2.3.2 Elaboración de yogurt y suero de yogurt	33
2.3.3 Preparación del nopal	34
2.4 MEDIO DE CULTIVO PARA MICROFLORA MIXTA DE POZOL	34
2.5 MEDIOS DE FERMENTACION	34
2.6 PREPARACION DEL INOCULO	35
2.7 INOCULACION DE LOS MEDIOS DE FERMENTACION	35
2.8 TOMA DE MUESTRAS	35
2.9 DETERMINACIONES ANALITICAS	36
2.9.1 pH	36
2.9.2 Acidez titulable	36
2.9.3 Humedad	37
2.9.4 Proteína cruda	37
2.9.5 Cenizas	39
2.9.6 Contenido neto proteico	39
2.9.7 Extracto etéreo	40
2.9.8 Fibra cruda	40
2.9.9 Proteína soluble	41
2.9.10 Nitrógeno amoniacal	43
2.9.11 Urea	43
2.9.12 Digestibilidad <i>in vitro</i>	45

2.9.13 Valor energético	45
2.10 ANALISIS ESTADISTICO	46
III. RESULTADOS Y DISCUSION	47
3.1 FERMENTACION DE MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO CON Y SIN INOCULACION	48
3.2 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON YOGURT O SUS COMPONENTES	59
3.3 EFECTO DE LA NIXTAMALIZACION EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ	65
3.4 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA	70
3.5 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO	75
3.6 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO A DIFERENTES CONTENIDOS INICIALES DE PROTEINA	81
3.7 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES	90
3.8 FERMENTACION DE MEZCLAS DE MASA DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL	102
3.9 FERMENTACION DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y NOPAL	114
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	123
V. BIBLIOGRAFIA	127

RESUMEN

El pozol es una bebida de origen maya, preparada por fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. En este trabajo se estudiaron algunos de los parámetros que podrían afectar el enriquecimiento proteico, debido a la fijación de nitrógeno en esta fermentación. Se evaluó el efecto de la inoculación, el tiempo óptimo de fermentación, el efecto de la adición de yogurt y sus componentes, de diversas fuentes de nitrógeno a diferentes concentraciones iniciales de proteína, así como, el efecto de la nixtamalización. Por último, se utilizaron otros materiales como sustrato (sorgo y nopal), con el fin de aplicar esta fermentación a cereales para alimentación animal y al aprovechamiento de subproductos agrícolas.

Se determinaron los cambios en el pH, acidez titulable, humedad, contenido de proteína y contenido neto proteico (%proteína-%cenizas). Se analizaron también los compuestos nitrogenados producidos durante la fermentación, como urea, amonio y proteína soluble. La composición proximal, digestibilidad *in vitro* y valor energético en una mezcla de maíz con nopal (1:1) se comparó con las de masa de maíz, sola y con harina de pescado.

En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas en el aumento del contenido neto proteico entre

las fermentaciones espontánea e inoculada con flora mixta de pozol. A los 9 días de fermentación se alcanzó el mayor incremento neto proteico. La fijación de nitrógeno se favoreció con la adición de ácido láctico y yogurt comercial, así como al suplementar con caseína a contenidos proteicos iniciales de 25 y 33.7%, con harina de pescado a niveles de 21.5 y 24.5% y con gluten de maíz a un nivel de 16.8%. La adición de calcio también favoreció el incremento neto proteico, aunque en un menor grado que el proceso de nixtamalización. El contenido de urea y amoníaco no aumentó con la fermentación, mientras que el contenido de proteína soluble sí presentó un aumento significativo. Al mezclar maíz nixtamalizado con sorgo y con nopal, se observó una fijación de nitrógeno, lo que podría ser aprovechado para la producción de alimentos para animales monogástricos. Se observó también un aumento en el valor energético de la mezcla maíz-nopal 1:1 suplementada con harina de pescado, el cual corresponde a las calorías aportadas por la proteína fijada.

INTRODUCCION.

Uno de los problemas más grandes a los que se enfrenta el país actualmente es la dificultad, cada día mayor, de proporcionar alimentación adecuada a la población en constante expansión. Este problema no se limita a la incapacidad de la mayoría de ésta de adquirir alimentos sanos y nutritivos, sino que, además, abarca la necesidad de importar suplementos nitrogenados, como soya y harina de pescado, para la alimentación animal.

Todo esto ha llevado a buscar nuevas fuentes de alimentos que proporcionen la cantidad necesaria de nutrientes, como es el aprovechamiento de subproductos agrícolas, pecuarios e industriales, que al ser procesados, se convierten en alimentos nutritivos para los animales.

El maíz constituye, inmediatamente después del arroz y el trigo, la tercera cosecha más importante de cereal en el mundo y ha sido uno de los principales alimentos de los habitantes de las zonas rurales de México y otros países latinoamericanos. También se utiliza en la alimentación de ganados vacuno y porcino, así como de aves de corral, en la fabricación de bebidas y en otras industrias. Sin embargo, es ante todo una fuente de energía con muy poco contenido de proteína (de 5 a 15%, dependiendo de la clase) y ésta es de baja calidad. Es pobre en calcio, sodio y magnesio y rico en fósforo, potasio y hierro (Berger, 1962).

Durante la fermentación del pozol se presenta un aumento en el contenido de nitrógeno proteico, de algunos aminoácidos, como lisina y triptofano y en vitaminas, como niacina y riboflavina y el aumento de peso en ratas alimentadas con pozol es mayor que en las alimentadas con maíz sin fermentar (Cravioto *et al.*, 1985).

Una alternativa para intentar solucionar los problemas mencionados sería la de aplicar, si es posible, la fermentación del pozol a desechos amiláceos agrícolas para alimentación animal, así como buscar una complementación que la mejore aún más para la alimentación humana.

OBJETIVOS GENERALES.

Estudiar la fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol, variando diversos parámetros, como fuente de nitrógeno, inoculación, adición de yogurt y nixtamalización.

Intentar sustituir el maíz en esta fermentación por desechos amiláceos y otros cereales.

CAPITULO 1

GENERALIDADES

1. GENERALIDADES.

1.1 POZOL.

1.1.1 Preparación.

El pozol es una bebida utilizada como alimento básico de varios grupos indígenas como lacandones, mayas, chontales, zapotecos, etc. en los Estados de Chiapas, Tabasco, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Quintana Roo (Cruz y Ulloa, 1973).

Para la preparación del pozol el maíz es cocido en agua con cal (1% w/v) durante 30 min. Después de remojarlo durante 15 horas los granos son lavados, frotándolos con las manos para desprender el pericarpio. Posteriormente, son machacados y amasados, formando bolas de tamaño variable según la región, las cuales son envueltas en hojas de plátano y se dejan fermentar por 4 o 5 días, o hasta dos semanas, también dependiendo de la región. La masa fermentada se diluye en agua. Se puede tomar con sal, pimienta y chile. En Tabasco y Oaxaca se le agrega cacao tostado y molido y en Yucatán coco (Cruz y Ulloa, 1973).

1.1.2 Microbiología:

En 1971 se reportó por primera vez la fijación de nitrógeno

atmosférico, en forma libre o combinada, por microorganismos de un alimento fermentado, el pozol (Taboada et al, 1971).

La mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se destruyen durante la nixtamalización y es probablemente después de este proceso cuando la masa es inoculada. Debido a que no hay mucha higiene en las personas que la suelen preparar, las fuentes de inoculación son muchas. Sin embargo, hay varias especies de levaduras y hongos que se encuentran siempre en pozoles de diferentes lugares (Steinkraus, 1983).

La flora mixta del pozol está formada por bacterias, levaduras y hongos, siendo las dos primeras las más constantes al principio de la fermentación. Durante las primeras horas siempre se encuentran en el pozol *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum* y varias especies de *Candida*. Cuando las bolas 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*. Otras especies de hongos aisladas del pozol son: *Aerobasidium pullulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium spp.*, *Paezilomyces fumoroseus*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride*; *Penicillium claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. italicum* y *P. lanoso-viride* y *Phialophora richardstiae* (Steinkraus, 1983).

Durante las primeras etapas de la fermentación las bacterias superan en número a las levaduras y hongos y son,

atmosférico, en forma libre o combinada, por microorganismos de un alimento fermentado, el pozol (Taboada *et al*, 1971).

La mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se destruyen durante la nixtamalización y es probablemente después de este proceso cuando la masa es inoculada. Debido a que no hay mucha higiene en las personas que la suelen preparar, las fuentes de inoculación son muchas. Sin embargo, hay varias especies de levaduras y hongos que se encuentran siempre en pozoles de diferentes lugares (Steinkraus, 1983).

La flora mixta del pozol está formada por bacterias, levaduras y hongos, siendo las dos primeras las más constantes al principio de la fermentación. Durante las primeras horas siempre se encuentran en el pozol *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum* y varias especies de *Candida*. Cuando las bolas 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*. Otras especies de hongos aisladas del pozol son: *Aerobasidium pullulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium spp.*, *Paecilomyces fumosus*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride*; *Penicillium claviforme*, *P. cycloptum*, *P. expansum*, *P. italicum* y *P. lanoso-viride* y *Phialophora richardstiae* (Steinkraus, 1983).

Durante las primeras etapas de la fermentación las bacterias superan en número a las levaduras y hongos y son,

probablemente, las responsables de la mayoría de la producción de ácido (Steinkraus, 1983). Las bacterias lácticas y mesófilas aerobias alcanzan su máximo crecimiento a los 3 días y los mohos y levaduras a los 6 y 12 días, respectivamente (Aguilera, 1989).

Se han aislado también bacterias fijadoras de nitrógeno que pueden ser las responsables del aumento en el nitrógeno total. Entre las bacterias aisladas se encuentran *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*; dos nuevos microorganismos: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolís*, el primero de los cuales es fijador de nitrógeno; *Escherichia coli* var. *neapolitana*, *Pseudomonas mexicana* y *Aerobacter aerogenes* (Steinkraus, 1983).

Agrobacterium azotophilum fija nitrógeno atmosférico, aeróbica y anaeróbicamente, en la masa del maíz y en otros medios. En algunas muestras de pozol *Aerobacter aerogenes* es el que fija nitrógeno (Ulloa y Herrera, 1972). *Agrobacterium azotophilum* produce *in vitro* diferentes grados de antagonismo sobre varias bacterias y hongos patógenos (Ulloa y Herrera, 1982). Las bacterias fijadoras de nitrógeno empiezan a crecer a los 3 días y alcanzan su máximo crecimiento a los 12 días de fermentación (Aguilera, 1989).

Entre las levaduras aisladas se encuentran: *Candida krusei*, *Trichosporum cutaneum*, *Hansenula fabianii*, *Kluyveromyces fragilita*, *Candida guilliermondii*, *C. parapapstiosis*, *C.*

1.1.3 Factores que influyen sobre la fijación de nitrógeno en el pozol.

Taboada y Herrera (1972) estudiaron el efecto de la adición de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno por *Agrobacterium azotophilum*, utilizando el método de reducción de acetileno. Con dosis de 0.05 mM de asparagina, glicina, alanina, ácido glutámico o ácido aspártico se observó que la fijación es inhibida y el crecimiento aumenta notablemente. Con isoleucina y la D-metionina no se presentó un mayor crecimiento y sí un aumento en la fijación, por lo que se concluyó que estos aminoácidos no son utilizados para la multiplicación de las células sino para la fijación de nitrógeno. En 1971, los mismos autores habían encontrado que la concentración óptima estimulante de este fenómeno por el ácido glutámico y el ácido aspártico es de 0.002 mM para el primero y 0.001 mM para el segundo y si se aumentan estas concentraciones la fijación de nitrógeno disminuye. El aumento en la concentración de oxígeno también inhibe la fijación. Una vez iniciada ésta no es inhibida al agregar sustancias nitrogenadas como glicina, concluyéndose que estas sustancias inhiben sólo la formación de nueva nitrogenasa.

Se ha encontrado que al aumentar el contenido inicial de proteína en la fermentación del pozol, se presenta mayor fijación de nitrógeno. También fue estudiado el efecto de la

fuente de nitrógeno, suplementando con urea y caseína, encontrándose que con la primera no se presentó fijación (Alvarez y López, 1987). Las bacterias lácticas, presentes en el pozol, requieren proteína como fuente de nitrógeno (Gómez, 1983). Una vez que éstas asimilan la proteína y presentan su máximo crecimiento (Aguilera, 1989), los fijadores de nitrógeno pueden fijar éste, debido a la presencia en el medio de lactato de calcio (Muñoz y Viniegra, 1981) y a la ausencia de nitrógeno libre en el medio.

En 1975 Taboada *et al* estudiaron la fijación de nitrógeno en cultivos monoespecíficos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum*, usando diversas fuentes de carbono como atole de masa de maíz, D-glucosa, D-galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa, manitol y almidón soluble. Encontraron que hubo una mayor fijación en atole que con las otras fuentes y entre éstas las que dieron mejores resultados fueron maltosa y galactosa. *Agrobacterium azotophilum* no fijó nitrógeno en el medio de trehalosa y *Aerobacter aerogenes* lo hizo moderadamente, pero la mezcla de ambos duplicó las cantidades fijadas por éste último, por lo que parece haber sinergismo.

Estudios sobre el efecto de la inoculación en esta fermentación demostraron que si se añade yogurt a la masa no estéril se presenta una mayor fijación de nitrógeno que inoculándola con una mezcla de *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol (Alvarez y López, 1987), lo cual fue corroborado posteriormente por Aguilera (1989). La cepa pura

de *Agrobacterium azotophilum* por sí sola no produce aumentos considerables de proteína. Sin embargo, con la microflora mixta sí se obtienen incrementos notables (Leal *et al.*, 1987).

Comparando diversos sustratos, como plátano, col, sorgo nixtamalizado y almidón con gluten, con harina de maíz nixtamalizado en soluciones diluidas inoculadas con *Agrobacterium azotophilum* y flora mixta de pozol, se encontró que sólo se presentó fijación de nitrógeno cuando el sustrato contenía maíz (Leal *et al.*, 1987).

Aguilera (1989) observó dos periodos de fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol. El primero coincide con la fase exponencial de crecimiento de los fijadores de nitrógeno aerobios y el segundo se cree que corresponde a las anaerobias del género *Clostridium*. Murillo, por medio de la reducción de acetileno, observó que en esta fermentación la fijación de nitrógeno se encuentra en fase exponencial a los 9 días, alcanzando la fase estacionaria a los 12 días (Ezequiel murillo, comunicación personal).

La fermentación del pozol es de tipo heteroláctica (Aguilera, 1989) y el tiempo en que se alcanza el mayor incremento en el contenido neto proteico es a las 216 horas de fermentación (Wacher *et al.*, 1989).

1.2 FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO.

En 1888 Hellriegel y Wilfarth publicaron un artículo en donde se establecía por primera vez la fijación de nitrógeno atmosférico biológicamente. Tres décadas después se identificaron los organismos responsables de este fenómeno tanto simbióticamente como en forma libre (Emerich y Wall, 1987).

1.2.1 Fisiología.

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico parece estar restringida a microorganismos procariotes. Generalmente se produce en asociación con plantas. Esta asociación puede ser en la forma raíz-nódulo o dentro de la raíz (Vose y Bixt, 1984). Sin embargo, también existe fijación de nitrógeno por microorganismos que crecen en forma libre. Las bacterias libres fijadoras de nitrógeno pertenecen a un número limitado de familias o géneros (Mulder, 1975)

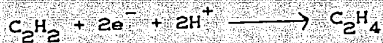
- a) *Azotobacter* aerobios;
- b) *Klebsiella* anaerobia facultativa;
- c) bacterias anaerobias facultativas del grupo de *Bacillus polymyxa* y *B. macerans*;
- d) la mayoría de los *Clostridia* anaerobios sacarolíticos;
- e) las bacterias anaerobias reductoras de sulfato del género de *Desulphovibrio* y *Desulphotomaculum* y
- f) bacterias fotosintéticas.

1.2.2 Nitrogenasa.

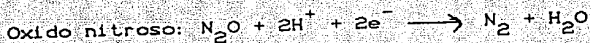
La reacción central de la fijación de nitrógeno y el sistema enzimático (nitrogenasa) responsable de esta reacción son similares en todos los fijadores de nitrógeno, libres y simbióticos:

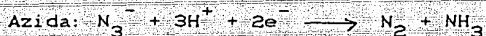


La reacción de inducción de ATP de la nitrogenasa también cataliza la conversión de acetileno a etileno, que se utiliza, generalmente, para medir la actividad de nitrogenasa (Mulder, 1975).



La nitrogenasa es capaz de reducir varias moléculas con doble y triple enlace, además del nitrógeno y el acetileno:





(Emerich y Wall, 1987)

La nitrogenasa es un sistema de multicomponentes. Las especies moleculares que se requieren para su actividad son dos proteínas. Una, con un peso molecular de 200,000-300,000 daltons, contiene hierro, molibdeno y azufre lábil, este último en una cantidad equivalente al contenido de hierro. Esta proteína se llama fracción I o F_1 o dinitrogenasa (Emerich y Wall, 1987). Los metales parecen estar arreglados en cuatro grupos Fe_4S_4 , dos cofactores hierro-molibdeno (FeMo) y posiblemente un centro Fe_2S_2 (Emerich y Wall, 1987). Shah y Brill extrajeron el cofactor FeMo de la dinitrogenasa. Este cofactor contiene 7-8 átomos de hierro por átomo de molibdeno y es capaz de unir y reducir el acetileno en presencia de un reductante apropiado (Emerich y Wall, 1987). El otro componente de la nitrogenasa es de menor tamaño (50,000 daltons), con menor contenido en hierro y azufre lábil y no contiene molibdeno, es la fracción II, F_2 o dinitrogenasa reductasa. Esta proteína posee dos sitios de unión

catalíticamente activos para el MgATP (Emerich y Wall, 1987). La unión MgATP aumenta la sensibilidad hacia el oxígeno, por lo que la proteína es dañada por este gas, siendo la proteína mayor o dinitrogenasa relativamente insensible a él (Rose, 1977).

Existe un factor de unión que no es esencial, pero que se encuentra en la enzima *in vivo*. Los participantes en la reacción son el nitrógeno, un donador de electrones, ATP y Mg^{++} . Las fuentes de electrones en microorganismos anaerobios son el formato, el hidrógeno molecular y el piruvato; en los aerobios, los electrones se originan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Los electrones se transfieren a un vector del tipo de la ferredoxina o de la flavodoxina, el cual participa en forma reducida, en la reacción catalizada, transfiriendo un electrón a la dinitrogenasa reductasa, después es transferido a la dinitrogenasa con la hidrólisis de 2 moléculas de MgATP a MgADP. La MgATP-dinitrogenasa reductasa reducida se asocia rápidamente con la dinitrogenasa (Emerich y Wall, 1987).

Se ha propuesto que el ATP funciona como una fuente de protones, como un activador de electrones o como un inductor de cambios de conformación en las proteínas de la nitrogenasa (Rose, 1977).

La enzima F_2 , que es muy sensible al oxígeno, puede funcionar en las bacterias aerobias merced a dos mecanismos de protección. Existe una protección de conformación, por medio

de la cual la enzima se hace insensible al oxígeno (e incapaz de catalizar la fijación de nitrógeno) al sufrir un cambio de conformación. En segundo lugar, la enzima puede ser protegida, manteniéndose en una forma catalíticamente activa, mediante un proceso de eliminación de oxígeno, como una actividad respiratoria (Rose, 1977; Moo-Young et al, 1986).

1.2.3 Inhibidores de la fijación de nitrógeno.

Los inhibidores llamados clásicos son aquellos compuestos que le sirven de sustrato a la nitrogenasa. Estos inhibidores se pueden clasificar en 5 grupos, dependiendo de su patrón de inhibición contra los otros sustratos: 1) H_2 , N_2O y ciclopropeno. Estos compuestos son competitivos con el N_2 . 2) CN^- , N_3 y CH_3NC . Son competitivos entre ellos, pero no lo son con el N_2 . 3) Acetileno. No es competitivo con el N_2 y el N_3^- , pero el nitrógeno sí lo es con el acetileno. 4) Monóxido de carbono. Es competitivo con todos los sustratos, pero no puede bloquear la reducción de hidrógeno y 5) Hidrógeno. La reducción de H^+ no es inhibida por la presencia de hidrógeno ni bloqueada por el CO. (Burris, 1975).

1.2.4 Efecto de factores externos en la fijación de nitrógeno.

Además del sustrato, las bacterias fijadoras de nitrógeno de crecimiento libre pueden ser afectadas por otros factores, incluyendo nutrición mineral, oxígeno, presencia de nitrógeno combinado, particularmente NH_4^+ , y energía.

1.2.4.1 Nutrición mineral.

Molibdeno. Está contenido en uno de los dos componentes de la nitrogenasa. Sin la cantidad adecuada de este metal no se presenta un acarreo eficiente de electrones (Silvester, 1989). La adición de amonio elimina la necesidad de molibdeno en *Azotobacter* y posiblemente en otros fijadores de nitrógeno libres. El nitrato no se puede utilizar como fuente de nitrógeno cuando hay deficiencia de molibdeno en las bacterias de existencia libre pues la nitrato reductasa, similar a la nitrogenasa, es una enzima que lo contiene. Sin embargo, la necesidad de este metal en *Azotobacter* suplementado con nitrato es mucho menor (Mulder, 1975).

Vanadio. En algunas bacterias de existencia libre puede ser sustituto del molibdeno. Existen dos hipótesis: que en los microorganismos tratados con vanadio hay una V-nitrogenasa o bien que los microorganismos contienen trazas de molibdeno, que es el responsable de la actividad de la nitrogenasa y el efecto del vanadio sería estabilizar la proteína-Mo unida en la nitrogenasa.

Hierro. No es extraño su requerimiento en bacterias, pues forma parte de otros acarreadores de electrones como ferredoxina y citocromos.

Potasio. Es esencial para las bacterias de existencia libre.

Si un cultivo de *Azotobacter* tiene deficiencia de éste, su crecimiento se reduce y se detiene completamente. La fijación de nitrógeno es menos afectada, lo que indica que su participación en este mecanismo es indirecta.

Calcio. Es necesario para algunos microorganismos como *Azotobacter*, pero para otros no lo es (Mulder, 1975). Rangeley y Knowles (1988) encontraron fijación de nitrógeno no simbiótica en turba sólo cuando adicionaron calcio.

Magnesio. Es un cofactor en varias reacciones enzimáticas que no conciernen directamente con la fijación de nitrógeno, pero es necesario para ésta (Mulder, 1975).

Metales pesados. Babich y Stotzky (1985) demostraron que los metales pesados inhiben la fijación de nitrógeno en suelos.

1.2.4.2 Oxígeno.

Es necesario para las bacterias de existencia libre aerobia, para obtener energía. A un determinado valor de presión de oxígeno, la reducción de acetileno disminuye, debido en parte a la oxidación de los reductores necesarios en la fijación de nitrógeno y en parte a la sensibilidad de la nitrogenasa, particularmente la proteína-Fe a exposiciones prolongadas a exceso de oxígeno. La actividad perdida puede ser reparada disminuyendo la presión de oxígeno al óptimo. La acción

inhibitoria del oxígeno en la fijación de nitrógeno en bacterias de existencia libre es clara en algunas bacterias anaerobias facultativas, que fijan nitrógeno sólo bajo condiciones anaerobias y en algunos casos a presiones de oxígeno bajas (Rose, 1977).

1.2.4.3 Nitrógeno combinado.

Cuando el amonio está presente ocurre una rápida asimilación de este compuesto. Inmediatamente después de su adición al medio, se reprime la síntesis de nitrogenasa. Mientras que las células crecen y se dividen, la nitrogenasa decrece por dilución. Los microorganismos del tipo *Clostridium butyricum* pueden fijar nitrógeno en presencia de amonio. Una sobreproducción temporal de éste a partir de nitrógeno, no lleva a una depresión inmediata de la nitrogenasa, como en el caso de los microorganismos aerobios, pero puede conducir a una excreción de amonio. En bacterias aerobias del tipo *Azotobacter*, inmediatamente después de la adición de pequeñas cantidades de amonio, la actividad de la nitrogenasa declina y se detiene en una o dos horas. Esto parece ser debido no a la represión de la síntesis de nitrogenasa, ni a la inhibición por retroalimentación, sino a una competencia por reductores y/o ATP entre la actividad de la nitrogenasa y la asimilación de amonio (Mulder, 1975). Sin embargo, Jensen y Holm (1975) encontraron que el nitrógeno combinado favoreció la fijación de nitrógeno al utilizar una mezcla de un microorganismo

fijador de existencia libre y un moho, debido a que el moho utilizó el nitrógeno del medio y el fijado para su crecimiento.

1.2.4.4 Energía.

La fijación de nitrógeno exige una considerable cantidad de energía. La nitrogenasa requiere ATP para la catálisis y es inhibida por el ADP. La relación ADP/ATP afecta la transferencia de electrones, la distribución de los electrones en el sustrato y la actividad total. *In vivo*, las células fijadoras de nitrógeno tienen relaciones ADP/ATP de 0.3-0.5, mientras que los microorganismos en condiciones de no-fijación tienen una relación de 0.8-0.9 (Emerich y Wall, 1987).

1.2.5 Regulación genética.

Muchos de los instrumentos genéticos disponibles para *Escherichia coli* pueden ser aplicados a *Klebsiella pneumoniae*, por lo que esta bacteria presenta grandes ventajas para el análisis genético de la fijación de nitrógeno.

1.2.5.1 Regulón *nif* de *Klebsiella pneumoniae*.



Figura 1.1 orden, organización del operón y dirección de transcripción de los genes del regulón *nif* de *Klebsiella*

pneumoniae (Emerich y Wall, 1987).

El regulón *nif* está contenido en un segmento de 23 Kb. Ocho unidades transcripcionales leen en dirección a los genes de la biosíntesis de histidina. Todos los genes excepto el *nifW* producen una proteína (Emerich y Wall, 1987). Bajo condiciones energéticas desfavorables se presenta un control translacional del producto del gen *nif* (Stougaard y Kennedy, 1988).

La dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa están codificadas por los genes *nifH* y *nifKD*, respectivamente. El gen *nifF* codifica a una flavoproteína, que es esencial para el transporte de electrones. La proteína del *nifJ*, que contiene 30 moles de hierro y 24 de azufre lábil/mol de proteína, es una oxido-reductasa. Las proteínas de los genes *nifB*, *nifN* y *nifE* están involucradas con el cofactor FeMo, mientras que las del gen *nifM* lo están con una modificación post-transcripcional del producto del gen *nifH*. El *nifV* puede estar involucrado con una modificación post-transcripcional de la dinitrogenasa. La maduración de la dinitrogenasa está influida por los genes *nifS* y *nifU*. El producto del *nifA* es requerido para la expresión de todos los genes *nif* excepto para su propio operón (*nifLA*), (Emerich y Wall, 1987). La represión específica de *nif* por NH_4 y O_2 ocurre exclusivamente por inhibición de la transcripción y la represión por el O_2 es independiente de la regulación transcripcional del operón *nifLA* (Cannon, *et al.*, 1985). El gen *nifQ* parece influir en la

selección del sustrato, mientras que los genes *nifX* y *Y* parecen no ser necesarios para la fijación de nitrógeno (Emerich y Wall, 1987).

La represión de la nitrogenasa por el amonio ocurre a nivel de la transcripción, estando involucrado el sistema asimilatorio del amonio. Este, que es el producto final de la fijación de nitrógeno, es asimilado por la acción sucesiva de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa.

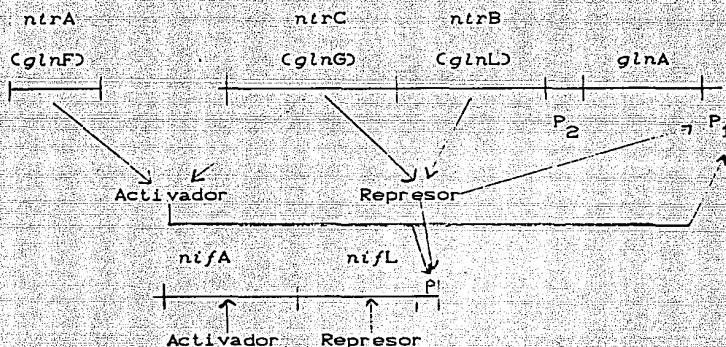


Figura 1.2 Modelo para la regulación del metabolismo del nitrógeno. La designación *ntr* deriva de la regulación de nitrógeno. Las designaciones de los genes en paréntesis son las utilizadas en *Escherichia coli*.

La pérdida de *ntrA* o *ntrC* da como resultado la pérdida de la expresión de los genes controlados por nitrógeno. Cuando el nitrógeno es limitante, la proteína de *ntrA* interactúa con la proteína del *ntrC* para formar un activador. Esta proteína

también interactúa con la del *ntrB* para formar un represor cuando los niveles de amonio son altos. A consecuencia de la pérdida de *ntrC* se eliminan la represión y activación del *glnA*, dando como resultado una expresión débil de *glnA*, insensible a la disponibilidad de nitrógeno.

En *E. coli* y *K. pneumoniae* la proteína P_2 , un componente del sistema de adenilización para glutamina sintetasa, es un corepresor capaz de interactuar con el complejo *ntrBC*.

La transcripción del *nifLA* está controlada por el sistema regulatorio de nitrógeno y los productos de este operón regulan al resto de los operones. Puesto que *nifL* y *nifA* son transcritos en un solo operón, la proteína *nifL* debe mantenerse en estado inactivado durante la fijación de nitrógeno y ser convertida a un estado represor al detectarse nitrógeno fijado.

En *K. pneumoniae* el molibdeno no es esencial para la síntesis de polipéptidos *nif*, ya que sin éste se produce algo de dinitrogenasa y puede ser activada mediante la adición de molibdato a las células. En este microorganismo también existe una forma de control a nivel de desestabilización del RNA mensajero para la expresión del *nif* (Emerich y Wall, 1987).

1.2.6 Comparación entre fijadores de nitrógeno de existencia libre y simbióticos.

En los primeros la fijación sólo ocurre en células en crecimiento, en las que el nitrógeno fijado se convierte en proteína celular. En células que no están creciendo ocurren acumulaciones de compuestos nitrogenados solubles, incluyendo amonio, que suprime la fijación de nitrógeno. En los simbióticos la fijación ocurre en bacteroides, que no están en fase de crecimiento.

En bacterias de existencia libre el tiempo de vida en que se presenta fijación de nitrógeno es de unas cuantas horas, debido a que sólo se presenta en la fase de crecimiento, mientras que en los bacteroides esta capacidad se mantiene por más de cuatro semanas.

En las bacterias simbióticas la cantidad de nitrógeno fijado/g de material celular es de 1.0-2.5g de nitrógeno, mientras que en las de existencia libre es de 0.1g.

La eficiencia de la fijación de nitrógeno es mucho mayor en las simbióticas debido a que los microorganismos de existencia libre están en crecimiento, por lo que un gran porcentaje de carbono y compuestos de energía es usado para la síntesis de su material celular. Asimismo, las bacterias aerobias de existencia libre requieren metabolizar alguna fuente de carbono para excluir el oxígeno de la nitrogenasa.

La actividad específica de fijación de nitrógeno es mucho mayor en las bacterias de existencia libre; sin embargo, la excreción del nitrógeno fijado en bacteroides es mayor al 90%, mientras que en las primeras sólo es del 7 al 13% (Mulder, 1975).

1.2.7 Crecimiento asociativo de bacterias fijadoras de nitrógeno con otros microorganismos.

Se ha comprobado que se pueden fijar cantidades considerablemente mayores de nitrógeno si los microorganismos fijadores crecen en asociación con otros, que cuando crecen en cultivos puros (Mulder, 1975).

En experimentos realizados con una bacteria fijadora de nitrógeno no identificada, que fue aislada del suelo de un bosque, se encontró que fijaba pequeñas cantidades de nitrógeno, pero con cultivos contaminados los rendimientos fueron mucho mayores. También se ha observado que las colonias de hongos estimulan fuertemente el crecimiento bacterial alrededor de ellas, y que la presencia de protozoarios disminuye el crecimiento de *Azotobacter*, pero sólo aumenta un poco la fijación de nitrógeno.

Los microorganismos con una capacidad limitada de fijación de nitrógeno en cultivos puros, pero que fijan mayores cantidades en cultivos mixtos, se denominan fijadores de nitrógeno

facultativos simbióticos. *Clostridium* puede fijar nitrógeno cuando contamina cultivos aerobios de otras bacterias. *Klebsiella*, que fija nitrógeno sólo anaeróbicamente, en cultivos mixtos puede fijarlo aeróbicamente (Jensen y Holm, 1975).

Hay asociaciones de microorganismos que degradan la fuente de carbono que no puede ser aprovechada por el fijador de nitrógeno, haciéndola aprovechable (Lynch *et al.*, 1984; Halsall y Gibson, 1985), al igual que otras que lo hacen con el hierro, molibdeno, etc., descomponiendo sustancias orgánicas.

Existen evidencias de sustancias promotoras de crecimiento en ciertos hongos. Las condiciones de crecimiento de los fijadores de nitrógeno pueden crearse eliminando sustancias tóxicas presentes en el medio original o producidas como subproductos por ellas mismas (Jensen y Holm, 1975).

Muñoz y Viniegra realizaron en 1981 estudios de fijación de nitrógeno atmosférico con un cultivo mixto de una bacteria láctica y *Azotobacter chroococum*, obteniendo una cantidad de nitrógeno fijado mucho mayor con la mezcla que con la bacteria fijadora sólo (14 y 5.75 mg de nitrógeno, respectivamente).

Se ha estudiado el efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococum*, *P. striata* y *A. awamori* en maíz, encontrándose un mayor incremento en el rendimiento de éste cuando se

inocularon los tres microorganismos mezclados con
microorganismos solubilizantes de fósforo (Kundu y Gaur,
1984).

CAPITULO II

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

11. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

La metodología utilizada para la realización de la presente investigación se presenta en la figura 2.1.

Los parámetros estudiados fueron:

1. Tiempo óptimo de fermentación.
2. Inoculación.
3. Compuestos nitrogenados producidos durante la fermentación.
4. Adición de yogurt o sus componentes.
5. Nixtamalización.
6. Contenido inicial de proteína.
7. Fuente de nitrógeno.
8. Aplicación de la fermentación a otros sustratos amiláceos.

2.1 MICROORGANISMOS.

El cultivo de la microflora mixta de pozol utilizado en este proyecto fue proporcionado por el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM. Este se recibió sembrado en una suspensión al 6% de harina de maíz nixtamalizado en agua, el cual fue originalmente obtenido a partir de pozol de Chiapas.

Con un asa estéril, en condiciones asépticas, se transfirió una pequeña cantidad del cultivo original a 350ml de medio de cultivo estéril para microflora mixta de pozol. El medio inoculado se incubó a 28° C.

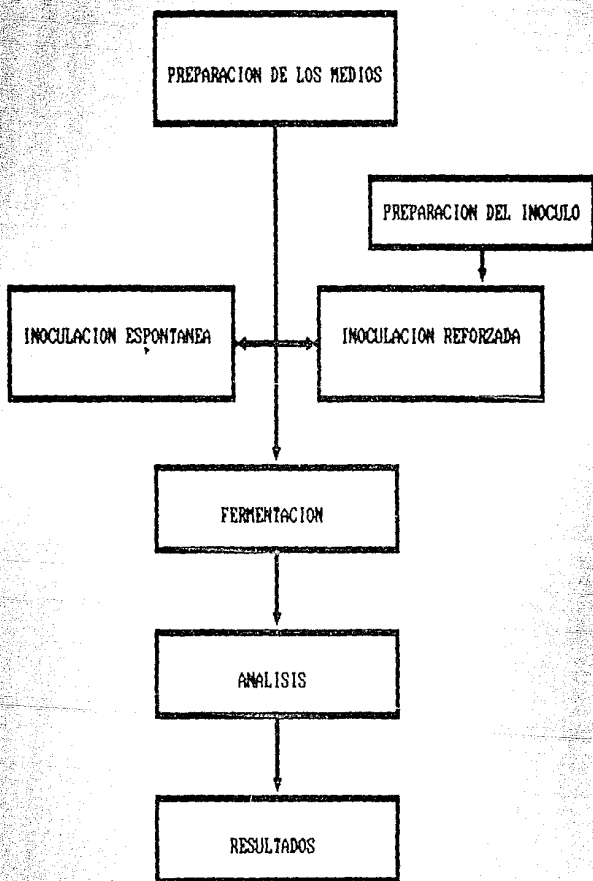


figura 2.1 Diagrama de flujo de la metodología de la investigación.

2.2 MATERIAS PRIMAS.

Como fuente de carbono para los experimentos se utilizaron diversas materias primas, de forma individual o combinada:

- Harina de maíz nixtamalizado "MASECA".
- Sorgo nixtamalizado.
- Maíz de la zona de Jalisco, proporcionado por Productos de Maíz, S.A. de C.V., nixtamalizado y sin nixtamalizar.
- Maíz de Toluca, adquirido en la Central de Abastos de la Ciudad de México, nixtamalizado. Este maíz se utilizó en los experimentos en los que se estudió la reproducibilidad de la fermentación de mezclas de maíz con sorgo nixtamalizados y de maíz nixtamalizado con nopal.
- Nopal.
- Yogurt natural y suero de éste elaborados en el laboratorio.
- Yogurt comercial "DELSA".

Como fuente de nitrógeno se utilizó:

- Caseína.
- Harina de pescado.
- Harina de soya integral.
- Gluten de maíz.

Minerales:

- Hidróxido de sodio.

2.3 PREPARACION DE LAS MATERIAS PRIMAS PARA LOS MEDIOS DE FERMENTACION.

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

La nixtamalización de los granos de cereales fue realizada en el laboratorio. Para ello, por cada parte en peso de granos, se adicionaron tres partes de una solución al 1% de agua con cal. Posteriormente, se les sometió a cocción durante media hora, en el caso del maíz, y 15 min., en el del sorgo, permitiendo que permanecieran en remojo en esta misma solución durante 15 y 12 horas, respectivamente. Se frotaron los granos hasta el desprendimiento del pericarpio, se lavaron con agua y se molieron en un molino eléctrico de cuchillas de tipo doméstico.

Cuando el maíz se utilizó sin nixtamalizar, se siguió el mismo procedimiento, pero sin agregar cal al agua.

2.3.2 Elaboración de yogurt y suero de yogurt.

A un litro de leche se le añadió un 10% en peso de yogurt Delsa y se incubó a 45°C durante 12 horas.

El suero de yogurt se preparó centrifugando el yogurt a 5000rpm durante 15 min. en una centrífuga Damon IEC HT.

En los casos en que se utilizó yogurt y suero estériles, se esterilizaron en autoclave a 121° C. a una presión de 1.2 Kg/cm^2 durante 15 min.

2.3.3 Preparación del nopal.

Al nopal se le quitaron las espinas con un cuchillo. Posteriormente se lavó, se cortó y se molió en licuadora.

2.4 MEDIO DE CULTIVO PARA MICROFLORA MIXTA DE POZOL.

Se disolvieron 10g de harina de maíz nixtamalizado Maseca en 1000 ml de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121° C y una presión de 1.2 Kg/cm^2 durante 15 min.

2.5 MEDIOS DE FERMENTACION.

Se prepararon medios semisólidos, empacados en forma esférica, con harina o con masa de maíz nixtamalizado. Cuando se preparó a partir de harina, se le agregó agua hasta obtener una masa con 50-60% de humedad. Se tomaron porciones de 150g y, cuando fue necesario, se ajustó el contenido de proteína inicial al valor deseado con las diferentes fuentes de nitrógeno. Posteriormente, se les dió forma esférica, empacándose en película plástica impermeable a gases, a la que se le practicaron pequeñas perforaciones, excepto en el primer experimento en que los medios se colocaron en frascos de vidrio de 750cc., y se incubaron a 28° C.

2.6 PREPARACION DEL INOCULO.

Para determinar el momento adecuado para utilizar el cultivo de microflora mixta de pozol como inóculo, se siguió el siguiente procedimiento: Se tomaron 10 ml de medio recién inoculado, agregándoseles unas gotas de solución saturada de cloruro de mercurio y se centrifugaron durante 10 min. a 2500 rpm. El sobrenadante se guardó en un frasco de 5 ml bien tapado para utilizarse como blanco, con el fin de seguir el desarrollo de los microorganismos. Se tomaron 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 nm en un espectrofotómetro Baush y Lomb. Al llegar a una transmitancia de 25% se utilizó como inóculo.

2.7 INOCULACION DE LOS MEDIOS DE FERMENTACION.

En el primer experimento, se tomaron 45ml del inóculo y se agregaron a las masas del medio 1.

2.8 TOMA DE MUESTRAS.

Para cada medio de fermentación se prepararon 6 muestras, excepto en el primer experimento, en el que se contaba con 18 muestras. Para cada tiempo de fermentación, se sacrificaban 3 muestras, las cuales se procesaron individualmente para sus

determinaciones analíticas de la siguiente forma: De la muestra húmeda se tomaron 5g para la determinación de pH y acidez titulable y 50g fueron secados para la determinación de humedad, proteína cruda, cenizas y, en algunos casos, proteína soluble, urea, amonio, grasa, fibra cruda, digestibilidad *in vitro* y calorimetría.

2.9 DETERMINACIONES ANALITICAS.

2.9.1 pH

Se colocaron 5g de muestra en un matraz y se aforaron con agua destilada a 25 ml. Una vez agitado vigorosamente, se trasladaron 10 ml a un vaso de precipitados de 25 ml y se tomó lectura en un potenciómetro Sargent-Welch, Mod. LSX, con electrodo de vidrio, previamente calibrado (Horwitz, 1980).

2.9.2 Acidez titulable.

De la muestra aforada a 25 ml, se tomaron 10 ml en un vaso de precipitados de 80 ml, agregándose 3 gotas de indicador de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.01N hasta llegar a un vire rosa pálido (Horwitz, 1980).

Cálculos:

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

Donde:

V= ml de hidróxido de sodio gastados

N= normalidad del hidróxido de sodio

0.09= miliequivalentes de ácido láctico

S= factor de dilución.

2.9.3 Humedad.

Se pesaron 10g de muestra en una termobalanza Ohaus y cuando se estabilizó el peso durante 5 min. se tomó la lectura.

2.9.4 Proteína cruda (Método de Microkjeldahl).

El principio de este método consiste en que, al ser oxidadas las proteínas y demás materia orgánica por el ácido sulfúrico, el nitrógeno presente se convierte en sulfato de amonio. Al hacer reaccionar 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 (Horwitz, 1980).

Para la determinación de proteína se pesó 0.05g de muestra

seca en papel glassine y se colocaron en un matraz microkjeldahl de 30 ml. Se añadieron 2 ml de mezcla digestora (300 ml de ácido sulfúrico, 100 ml de ácido fosfórico, 3g de sulfato de cobre y 3g de dióxido de selenio). Se calentó la mezcla en reacción hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz estuvo completamente clara, 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 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, utilizando fenolftaleína como colorante. Se determinó un blanco con un pedazo de papel igual al utilizado para la muestra.

Cálculos:

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

Proteína (%) = nitrógeno (%) x 6.25

2.9.5 Cenizas.

En un crisol a peso constante (a 600° C durante 1 hora), se colocó una cantidad exacta de muestra (0.5g) y se quemó lentamente el material sobre una parrilla hasta no haber desprendimiento de humos, sometiéndose el crisol con la muestra a calcinación en una mufla a 600° C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se transfirió a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente se pesó el crisol (Horwitz, 1980).

Cálculos:

Cenizas (%) = (P - p) x 100/g muestra

Donde:

P = peso del crisol con las cenizas

p = peso del crisol vacío

2.9.6 Contenido neto proteico.

El contenido neto proteico se calculó dividiendo el contenido de proteína cruda entre el contenido de cenizas.

Contenido neto proteico = Proteína cruda / cenizas.

2.9.7 Extracto etéreo.

El extracto etéreo esta constituido por todas las sustancias solubles en éter, como grasas, aceites esenciales, colesterol, fitosterol, ceras, etc. (Horwitz, 1980).

Se pesaron 2g de muestra en un cartucho previamente pesado. Se colocó un poco de algodón sobre la muestra y se puso en un aparato Soxhlet Labconco.

Previamente, se pesó un vaso de precipitados, que había estado durante una hora en una estufa a 100° C. Se le agregó éter y se conectó al aparato. Se calentó y después de tres horas, cuando ya no quedaron residuos, se sacó la muestra y se evaporó el éter. El vaso se colocó en la estufa a 100° C hasta alcanzar un peso constante.

Cálculos:

Extracto etéreo (%) = $(P - p) \times 100 / \text{g muestra}$

Donde:

P= peso del vaso con el extracto etéreo

p= peso del vaso vacío.

2.9.8 Fibra cruda.

La fibra cruda está compuesta por compuestos orgánicos insolubles en ácido sulfúrico y en hidróxido de sodio a ebullición (Horwitz, 1980).

Se pesaron 2g de la muestra desengrasada en el soxhlet y se colocaron en un vaso de precipitados de 500 ml, adicionando 0.5g de asbesto digerido y 200 ml de solución al 1.25% de ácido sulfúrico caliente. Se conectó a un digestor para fibra cruda y se dejó hervir durante 30 min. Se filtró através de una tela de algodón. Se lavó con agua destilada caliente hasta que no presentó reacción ácida al rojo de metilo. El residuo se regresó al vaso y se repitió todo el procedimiento con una solución de hidróxido de sodio caliente al 1.25%. Después de 30 min., se filtró en un crisol Gooch con asbesto digerido y se lavó con agua destilada caliente hasta que no hubo reacción alcalina. Se secó a 100° C, se dejó enfriar y se pesó. Posteriormente, se calcinó a 900° C, se dejó enfriar y se volvió a pesar.

Cálculos:

Fibra cruda (%) = $(E-M) \times 100/g$ muestra

Donde:

E= peso del crisol después de secarlo en la estufa

M= peso del crisol después de calcinarlo en la mufla

2.9.9 Proteína soluble (Método de Lowry)

El fundamento de este método consiste en la reacción del cobre en álcali con la proteína y la reducción del reactivo fosfomolibdato-fosfotungstato por la proteína tratada con el

cobre, que provoca la desaparición del color amarillo original del fosfomolibdato, debido a su disociación (Lowry *et al.*, 1951).

Reactivos:

Solución A: 2% de carbonato de sodio y 0.02% de tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1N.

Solución B: 0.5% de sulfato de cobre disuelto en agua destilada con una gota de ácido sulfúrico.

Solución C: 50 ml de solución A mezclados con 1 ml de solución B.

Solución D: Se prepara justo antes de utilizarse. Se mezcló una parte de reactivo Folin-fenol con una parte de agua destilada.

Procedimiento:

Se pesaron 0.022g de muestra y se disolvieron en 40 ml de agua destilada. Se calentó y agitó durante 15 min. para solubilizar la proteína. Se centrifugó a 7300 rpm durante 15 min. en una centrifuga Damon IEC HT, desechándose el precipitado.

Se colocó 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensaye y se le agregaron 3 ml de solución C. A los 10 min. se adicionó 0.3 ml de solución D, agitándose inmediatamente con un agitador eléctrico. Se permitió que reposara durante 30 min. a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer contra un blanco preparado de la misma manera con 1 ml de agua destilada, en vez de la

solución problema.

Se calculó la concentración de proteína a partir de una curva estándar preparada con seroalbúmina bovina en concentraciones de 10 a 100 µg/ml, tratadas con los reactivos.

2.9.10 Nitrógeno amoniacal (Método del óxido de magnesio)

En este método se libera el nitrógeno amoniacal con el óxido de magnesio y, posteriormente, se titula con una solución 0.1N de hidróxido de sodio (Horwitz, 1980).

Se pesaron 3 g de muestra en un frasco de digestión de 500 ml con 200 ml de agua destilada y 2g de óxido de magnesio. Se conectó a un aparato de destilación Kjeldahl Labconco y se destilaron 50 ml, recibiendo en 50 ml de ácido clorhídrico 0.1N. Se tituló con hidróxido de sodio 0.1N, utilizando rojo de metilo al 0.2% en alcohol como indicador.

Cálculos:

Nitrógeno amoniacal (%) = $(\text{ml HCl} \times \text{N HCl}) - (\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH}) \times 0.014 \times 100 / \text{g muestra}$

2.9.11 Urea (Método de DAM)

Este método se basa en la aparición de color al reaccionar la diacetilmonoxima con la urea en presencia de ácido sulfúrico, que al oxidarse cambia de amarillo a naranja y rojo. Los

pigmentos que se obtienen de la reacción son derivados de un anillo de pirimidina que se forma por una condensación oxidativa, la cual involucra un grupo metilo del diacetil. El compuesto que se obtiene es un derivado de triazina (Fearon, 1939).

Se pesó 0.022g de muestra, a la que se le añadió 40 ml de agua destilada. Se calentó y agitó durante 15 min. Se centrifugó en una centrífuga Damon IEC HT durante 15 min. a 7300 rpm. Se tomó 0.1 ml del sobrenadante y se mezclaron con 2 ml de solución al 5% de ácido tricloroacético. Se volvió a centrifugar durante 5 min. a 3200 rpm. Se mezcló 0.1 ml del sobrenadante con 2 ml de una solución de catalizadores preparada con cloruro de hierro 1.6mM, tiosemicarbazida 5mM, ácido sulfúrico 1.3M, y ácido fosfórico 4M, y 2 ml de diacetilmonoxima 140mM. Se agitó en un agitador eléctrico, sometiénolo a ebullición en baño maría durante 6 min. Se dejó reposar durante 10 min. a temperatura ambiente y se tomó lectura de la absorbancia a 525 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, contra un blanco preparado de la misma forma con 1 ml de agua destilada en vez de la solución problema.

Se calculó la concentración de urea a partir de una curva patrón preparada con urea en concentraciones de 100 a 101.9 mg/100ml, tratadas con los reactivos.

2.9.12 Digestibilidad in vitro.

La muestra se digiere durante 16 horas con una solución ácida de pepsina caliente bajo agitación constante. El residuo insoluble se filtra, lava y analiza el contenido de proteína cruda (Horwitz, 1980).

Se pesó 1g de muestra previamente desengrasada en el soxhlet y se le añadieron 150 ml de solución al 2% de pepsina 1:10,000 en ácido clorhídrico 0.075N precalentada a 42-45° C. En un agitador orbital de cámara de temperatura controlada Edisa-Comit se incubó durante 16 horas a 45°C. Se filtró con un papel Wattman 2, lavando 3 veces con agua destilada caliente y se determinó proteína cruda por el método de microkjeldahl.

Cálculos:

Proteína indigerible en la muestra (%) = $(\text{Proteína indigerible} / \text{Proteína total}) \times 100$

Proteína cruda digerida (%) = $100 - \text{proteína indigerible}$

2.9.13 Valor energético.

Esta determinación fue realizada por el DMVZ Eduardo Porras L. en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Se utilizó una bomba calorimétrica Parr 1341.

Se pesó 1g de muestra y se colocó en un recipiente de acero o bomba previamente pesada. Después de que la bomba estuvo cargada con oxígeno, se encendió la muestra, disipándose el calor en un volumen conocido de agua que rodea a la bomba. Se calculó el valor energético como la diferencia de la temperatura antes y después de la combustión, teniendo en cuenta que una Kcal es la cantidad de calor que se requiere para elevar la temperatura de un Kg de agua un grado centígrado (Corinne, 1979), (Parr Operating Instructions, 1984).

2.10 ANALISIS ESTADISTICO.

Para estudiar el efecto de la inoculación y el tiempo óptimo de fermentación se aplicó el análisis estadístico Anova para una probabilidad del 95% y el análisis de Varianza Oneway en los casos en que sólo se analizó un efecto. Este último se efectuó sobre los incrementos o decrementos en los resultados, ya que los contenidos iniciales de los parámetros estudiados en los diferentes medios comparados generalmente no son iguales, al ser éstos suplementados con diversas sustancias o contenidos iniciales de proteína cruda.

Cuando se observaron diferencias significativas en los resultados se aplicó la prueba de rango múltiple Duncan y/o Contrastes para una probabilidad del 95%.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

III RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1 FERMENTACION DE MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO CON Y SIN INOCULACION.

Existen diversas fermentaciones tradicionales que han sido mejoradas mediante el uso de inoculos estandarizados, como son el yogurt, el tempe, el natto, el miso, la salsa de soya, etc. (Prescott y Dunn's, 1982). Resultaba, por ello, interesante comparar en un primer experimento la evolución de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado inoculada con microflora mixta de pozol con la de masa fermentada espontáneamente.

En experimentos realizados anteriormente, Alvarez y López (1987) compararon el incremento en el contenido de proteína cruda en masas de maíz inoculadas con microflora mixta de pozol y *Agrobacterium azotophilum*, y en masas fermentadas espontáneamente, observando que dicho incremento fue mayor en las masas inoculadas. Para corroborar este resultado y determinar en cuál de los medios se presenta un mayor incremento neto proteico, se prepararon masas de maíz nixtamalizado en forma esférica. Unas se inocularon con microflora mixta de pozol y otras fueron fermentadas espontáneamente (Tabla 3.1), tomándose muestras al inicio y

después de 3, 6, 9, 12 y 15 días de fermentación.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.2 y en las Figuras 3.1 a 3.6, habiéndose evaluado los cambios de humedad, pH, acidez titulable, proteína cruda, contenido neto proteico, proteína soluble, amoníaco y urea. Se aplicó el análisis estadístico Anova para determinar si se presentaron diferencias significativas (P= 95%) en los resultados.

Se intentó, además, medir la fijación de nitrógeno por medio de la reducción de acetileno. Sin embargo, al añadirle éste al sistema, se observó una alteración en la flora, ya que no hubo presencia de hongos. Por ello, se decidió no utilizar este método.

Se observó que el contenido de humedad tendió a aumentar, tanto en medios inoculados como fermentados espontáneamente, de 55 a 68% y de 51 a 62%, respectivamente (Tabla 3.2). Este fenómeno no había sido observado en investigaciones anteriores (Alvarez y López, 1987 y Aguilera, 1989). En este caso probablemente se debió a que las masas se incubaron dentro de frascos de vidrio herméticamente cerrados, no estando en contacto con el aire, lo que impidió la deshidratación de su superficie. Sin embargo, en los experimentos subsecuentes se observó que durante la incubación, el contenido de humedad disminuyó en algunos medios, mientras que en otros se presentó un aumento en dicho contenido, en especial cuando el espacio

Tabla 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA MAIZ NIXTAMALIZADO CON Y SIN INOCULACION.

MEDIO	PARAMETROS	
	Inoculo	Tiempo de fermentacion (Dias)
1	Microflora mixta de pozol	0,3,6,9,12 y 15
2	Espontanea	0,3,6,9,12 y 15

Tabla 3.2. EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO INOCULADA CON MICROFLORA MIXTA DE POZOL.

PARAMETROS					
Tiempo de fermentacion (Dias)	Inoculacion	Humedad (1)	Proteina cruda (2)	Cenizas (2)	Contenido neto proteico (3)
8	Flora mixta de pozol	55.8 ^a 1.4 Aa	8.8 ^a 8.6 BCa	2.4 ^a 8.1 Aa	3.7 ^a 8.1 Da
	Espontanea	51.8 ^a 2.1 Ab	9.4 ^a 8.9 ABa	2.6 ^a 8.1 Ab	3.6 ^a 8.2 Ba
3	Flora mixta de pozol	52.8 ^a 2.3 Aa	9.4 ^a 8.8 Ca	2.3 ^a 8.2 Aa	4.8 ^a 8.8 Ea
	Espontanea	57.8 ^a 3.5 Ba	9.4 ^a 8.8 Aa	2.7 ^a 8.4 ABa	3.8 ^a 8.3 BCa
6	Flora mixta de pozol	54.8 ^a 2.3 Aa	9.4 ^a 8.4 Ca	3.8 ^a 8.2 BCa	3.2 ^a 8.1 Ca
	Espontanea	68.8 ^a 1.6 BCDb	18.8 ^a 8.8 BCa	2.5 ^a 8.3 Aa	4.1 ^a 8.1 Cb
9	Flora mixta de pozol	68.8 ^a 2.5 Ba	12.5 ^a 8.6 Da	3.8 ^a 8.1 BCa	4.1 ^a 8.1 Ea
	Espontanea	57.8 ^a 1.8 BCa	11.3 ^a 8.9 Ca	2.6 ^a 8.1 Ab	4.3 ^a 8.2 Ca
12	Flora mixta de pozol	68.8 ^a 4.8 Ca	8.1 ^a 8.4 Ba	3.2 ^a 8.1 Ca	2.5 ^a 8.1 Ba
	Espontanea	62.8 ^a 1.5 CDb	9.4 ^a 8.8 Ab	3.2 ^a 8.2 Ba	2.9 ^a 8.2 Ab
15	Flora mixta de pozol	56.8 ^a 8.9 Aa	5.8 ^a 8.8 Aa	2.8 ^a 8.2 Ba	1.8 ^a 8.1 Aa
	Espontanea	62.8 ^a 4.1 Db	14.4 ^a 8.9 Db	4.3 ^a 8.6 Cb	3.4 ^a 8.3 ABb

- (1) g agua/100g muestra humeda.
 (2) g/100g muestra seca.
 (3) g proteina cruda/g cenizas.

Mayusculas distintas representan diferencias significativas entre los diferentes tiempos de fermentacion.

Minusculas distintas representan diferencias significativas entre la fermentacion inoculada y espontanea.

FIG. 3.1 CAMBIO EN EL pH DURANTE LA FERMENTACION DEL POZOL.

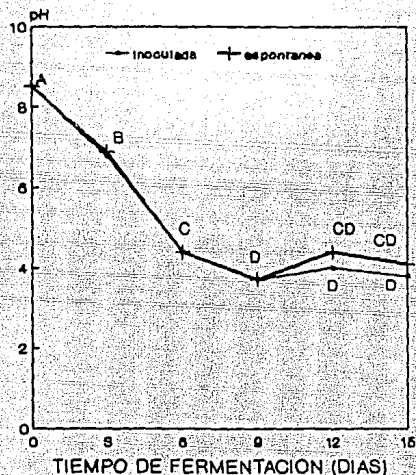
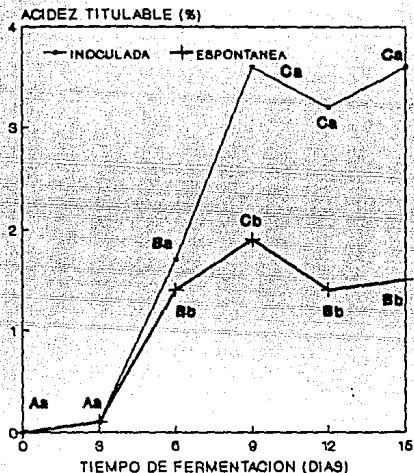


FIG. 3.2 CAMBIO EN EL CONTENIDO DE ACIDEZ TITULABLE DURANTE LA FERMENTACION DEL POZOL.



Mayúsculas distintas representan diferencias significativas entre los diversos tiempos de fermentación.

Minúsculas distintas representan diferencias significativas entre la fermentación inoculada y la espontánea.

FIG.3.3 CAMBIO EN EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA DURANTE LA FERMENTACION DEL POZOL

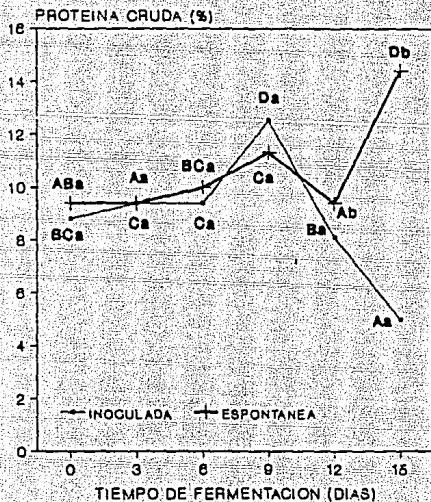
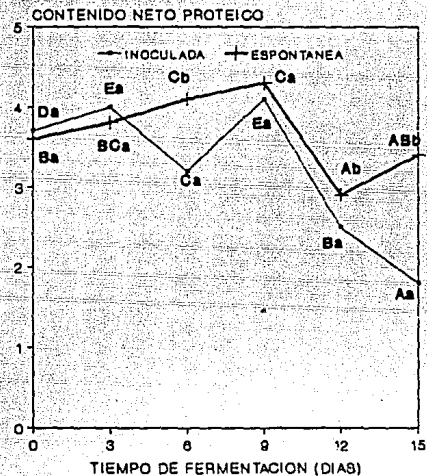


FIG.3.4 CAMBIO EN EL CONTENIDO NETO PROTEICO DURANTE LA FERMENTACION DEL POZOL



Mayúsculas distintas representan diferencias significativas entre los diversos tiempos de fermentación.
 Minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre la fermentación inoculada y la espontánea.

FIG.3.6 CAMBIO EN EL CONTENIDO NETO DE COMPUESTOS NITROGENADOS DURANTE LA FERMENTACION INOCULADA DEL POZOL

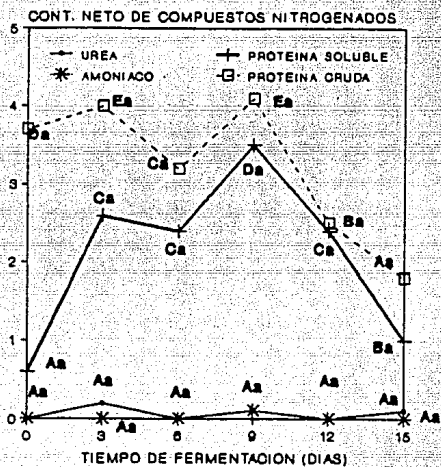
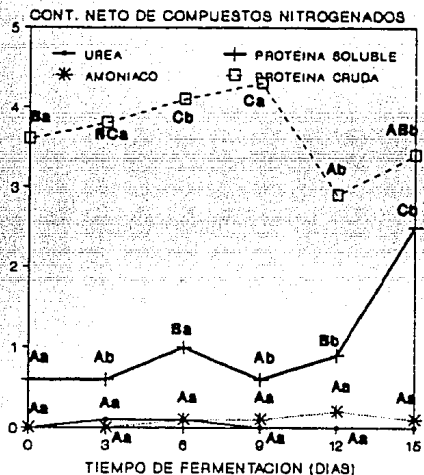


FIG.3.6 CAMBIO EN EL CONTENIDO NETO DE COMPUESTOS NITROGENADOS DURANTE LA FERMENTACION ESPONTANEA DEL POZOL



Mayúsculas distintas representan diferencias significativas entre los diversos tiempos de fermentación.
 Minúsculas distintas representan diferencias significativas entre la fermentación inoculada y la espontánea.

de las incubadoras era ocupado en su totalidad. Esto se debió también a que se impidió el paso del aire por su superficie, y, por lo tanto, la deshidratación no se llevó a cabo.

El pH descendió en ambos tipos de medios, alcanzando valores de 3.7 a los 9 días de fermentación (Figura 3.1). La acidez titulable alcanzó valores mayores en los medios inoculados, 3.6%, que en los fermentados espontáneamente (1.9%), observándose en ambos casos que dicho contenido llegó a los valores máximos a los 9 días de fermentación (Figura 3.2). Todo esto es indicativo de una fermentación de tipo láctico.

La inoculación influyó significativamente sobre el contenido de proteína cruda (Tabla 3.2, Figura 3.3) y el contenido neto proteico (Figura 3.4), presentándose un mayor aumento en las masas fermentadas espontáneamente, de 9.4 a 14.4% de proteína cruda, mientras que en las masas inoculadas ésta se incrementó de 8.8 a 12.5%. Sin embargo, al determinarse el contenido de cenizas, se observó que dicho aumento se debió a una pérdida de materia orgánica y que el contenido neto proteico alcanzó un valor máximo a los 9 días (4.3) al igual que en la fermentación inoculada (4.1). El contenido de cenizas de un medio corresponde al residuo inorgánico obtenido de la incineración de la muestra a altas temperaturas, es decir, a todos los minerales de la muestra. Debido a que la cantidad de cenizas no se modifica durante la fermentación, puesto que los microorganismos utilizan cantidades mínimas de minerales y,

además, son también calcinados, los minerales no son eliminados del sistema. Por ello, se puede utilizar el contenido de cenizas como base para realizar un balance de materia. Así, el incremento en la relación proteína/cenizas indica la entrada de nitrógeno al sistema y, por lo tanto, la presencia de fijación de nitrógeno.

Por otro lado, se observó que también el pH alcanzó el valor mínimo y la acidez titulable el máximo a los 9 días de fermentación, lo que parece indicar que existe una relación entre la fermentación láctica y la fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol, la cual había sido observada anteriormente por Alvarez y López (1987) y que podría ser debida a la producción de ácido láctico y a la transformación de éste en lactato de calcio al reaccionar con el calcio presente en el medio, el cual es una buena fuente de carbono para algunos microorganismos fijadores de nitrógeno (Muñoz y Viniegra, 1981).

El aumento en el contenido de proteína observado durante la fermentación del pozol ha sido atribuido a una fijación de nitrógeno (Alvarez y López, 1987). Se ha determinado que el nitrógeno atmosférico es fijado en forma de amonio (Mulder, 1975), el cual puede ser convertido en proteína por los microorganismos no fijadores por medio del sistema glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa y transaminación y por los fijadores por medio de la glutamato sintasa y la glutamina

sintetasa (Rose, 1977). Con el objeto de conocer los compuestos nitrogenados que se forman, se estudió la presencia de proteína, amonio y urea durante la fermentación con y sin inoculación.

Sólo fue posible detectar cantidades insignificantes de amonio (0.2% máximo), a pesar de que este compuesto podría estar presente no sólo por ser el primer producto de la fijación de nitrógeno, sino porque también puede ser producido por una desaminación oxidativa, reductora o desaturativa (Rose, 1977). Sin embargo, el amonio es asimilado rápidamente por los microorganismos, lo que explicaría su ausencia en el medio. Por otro lado, se encontraron también pequeñas cantidades de urea (0.2% máximo), la cual podía haber sido producida por medio del catabolismo de purinas y pirimidinas o de arginina (Rose, 1977), (Figuras 3.5 y 3.6).

En la fermentación inoculada con microflora mixta de pozol el compuesto nitrogenado presente en mayor cantidad fue la proteína soluble (3.5 a los 9 días). En la fermentación espontánea ocurrió lo mismo. Sin embargo, el tiempo en que se alcanzó el mayor contenido neto de proteína soluble (2.5 a los 15 días), no coincide con el tiempo en que se obtuvo el mayor contenido neto proteico (9 días), (Figuras 3.5 y 3.6). Es probable que los microorganismos de la microflora del pozol asimilen rápidamente el nitrógeno fijado, utilizándolo en la biosíntesis de proteína celular, permitiendo el aumento en

la cuenta viable de bacterias mesófilas aerobias y lácticas y en la de hongos y levaduras después de los 9 días de fermentación, observado por Aguilera (1989), quien también observó un mayor aumento en el contenido neto de proteína en dicho tiempo de fermentación.

El contenido de cenizas tendió a aumentar en ambos medios de fermentación (Tabla 3.2), indicando una pérdida continua de materia orgánica debido a la fermentación.

Con base en estos resultados se decidió que en todos los experimentos subsiguientes no se utilizaran inóculos, permitiendo que los medios fermentaran espontáneamente, ya que además de que no se observaron diferencias significativas en el contenido neto proteico, se consideró que el empleo de un inóculo consistente en una microflora mixta podría dificultar la obtención de resultados reproducibles, dado que el predominio de unos microorganismos u otros es muy variable y depende de las condiciones ambientales como pH, temperatura, nutrientes disponibles, etc. Se determinó, asimismo, tomar muestras al inicio y a los 9 días de fermentación, tiempo en que se observaron valores máximos en el contenido neto proteico.

3.2 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON YOGURT O SUS COMPONENTES.

Alvarez y López (1987) y Aguilera (1989) observaron un mayor incremento en el contenido neto proteico al fermentar masas de pozol inoculadas con yogurt que en masas fermentadas espontáneamente. Para estudiar las posibles causas de este incremento se fermentó masa de maíz suplementada con yogurt o sus componentes. Con harina de maíz nixtamalizado (Maseca) se prepararon masas y se suplementaron ya sea con un 10% de yogurt tanto en forma viable como estéril, o con un 10% de suero de yogurt viable o estéril, o bien, con un 0.1% de ácido láctico, cantidad de ácido que corresponde a la del yogurt, (Tabla 3.3).

El yogurt viable contiene microorganismos lácticos, agua, lactosa, lípidos, caseína, globulinas y albúminas, sales, vitaminas y enzimas, además de ácido láctico. El suero de yogurt, por su parte, contiene todos los compuestos del yogurt que son solubles en agua, como lactosa, globulinas y albúminas, vitaminas hidrosolubles, ácido láctico y microorganismos (Alais, 1981).

En la Tabla 3.4 se presenta la evolución en el contenido de humedad, del pH y de la acidez titulable durante la fermentación. En la Tabla 3.5 se indican los cambios en el contenido de proteína cruda, cenizas y contenido neto

Tabla 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADA SUPLEMENTADA CON YOGURT O SUS COMPONENTES.

MEDIO	SUPLEMENTACION				
	Yogurt viable (%)	Yogurt esteril (%)	Suero de yogurt viable (%)	Suero de yogurt esteril (%)	Acido lactico (%)
1	---	---	---	---	---
2	10	---	---	---	---
3	---	10	---	---	---
4	---	---	10	---	---
5	---	---	---	10	---
6	---	---	---	---	0.1

Los medios fueron preparados con harina de maiz nixtamalizado.

Tabla 3.4 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON YOGURT O SUS COMPONENTES.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	Humedad (1)		pH		Acidez titulable (2)	
	Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)	
	8	9	8	9	8	9
Control	52.5 [±] 0.5	48.0 [±] 0.0 a	7.1 [±] 0.1	5.5 [±] 0.1 d	0.1 [±] 0.0	1.0 [±] 0.1 a
Yogurt viable	56.0 [±] 1.5	53.0 [±] 0.0 a	6.4 [±] 0.1	3.0 [±] 0.1 b	0.1 [±] 0.0	1.9 [±] 0.1 a
Yogurt esteril	55.0 [±] 1.5	50.0 [±] 2.5 a	6.1 [±] 0.1	3.0 [±] 0.1 c	0.1 [±] 0.0	2.3 [±] 0.2 a
Suero viable	55.5 [±] 1.0	54.0 [±] 1.5 ab	6.3 [±] 0.1	3.0 [±] 0.1 bc	0.1 [±] 0.0	2.0 [±] 0.2 a
Suero esteril	56.5 [±] 3.0	53.0 [±] 1.5 a	6.7 [±] 0.0	3.7 [±] 0.0 a	0.1 [±] 0.0	2.5 [±] 0.3 a
Ac. Lactico	54.5 [±] 2.0	55.5 [±] 3.0 b	4.2 [±] 0.1	4.0 [±] 0.2 e	0.7 [±] 0.1	2.0 [±] 0.2 a

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. lactico/100g muestra húmeda.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

Tabla 3.5 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON YOGURT O SUS COMPONENTES.

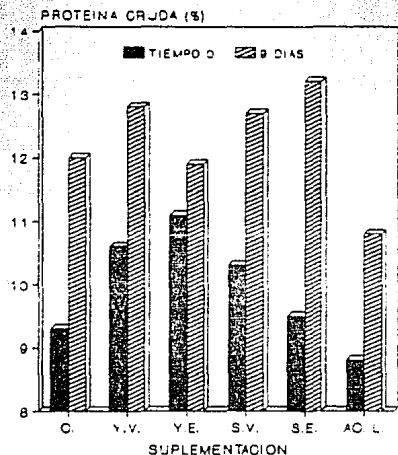
SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	Proteina cruda (1)		Cenizas (1)		Contenido neto proteico (2)	
	Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)	
	8	9	8	9	8	9
Control	9.3 ^a 0.3	12.8 ^b 0.8 bc	1.5 ^a 0.8	1.5 ^a 0.1 b	6.1 ^a 0.2	8.2 ^b 0.8 d
Yogurt viable	10.6 ^b 0.8	12.8 ^b 1.8 abc	1.4 ^a 0.1	1.7 ^b 0.1 c	7.4 ^a 0.8	7.8 ^b 0.6 c
Yogurt esteril	11.1 ^b 0.8	11.9 ^b 0.9 a	1.6 ^a 0.1	1.9 ^b 0.1 c	6.9 ^a 0.5	6.3 ^b 0.5 b
Suero viable	10.3 ^b 0.3	12.7 ^b 0.3 bc	1.3 ^a 0.1	2.0 ^b 0.2 d	7.8 ^a 0.2	6.3 ^b 0.1 a
Suero esteril	9.5 ^a 0.3	13.2 ^b 1.1 c	1.6 ^a 0.7	1.9 ^b 0.1 c	6.8 ^a 0.2	7.1 ^b 0.6 c
Ac. lactico	8.8 ^a 0.3	10.8 ^b 0.7 ab	1.7 ^b 0.1	1.4 ^a 0.1 a	5.3 ^a 0.2	7.8 ^b 0.5 d

(1) g/ 100g muestra seca.

(2) g proteina/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.7 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT Y SUS COMPONENTES SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ



C-CONTROL

Y.V.-YOGURT VIABLE

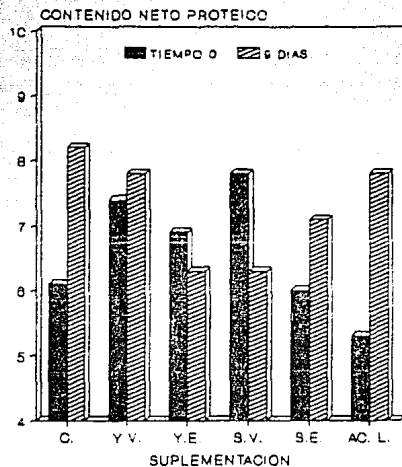
Y.E.-YOGURT ESTERIL

S.V.-SUERO VIABLE

S.E.-SUERO ESTERIL

AC. L.-ACIDO LACTICO

FIG.3.8 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT Y SUS COMPONENTES SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE HARINA DE MAIZ



C-CONTROL

Y.V.-YOGURT VIABLE

Y.E.-YOGURT ESTERIL

S.V.-SUERO VIABLE

S.E.-SUERO ESTERIL

AC. L.-ACIDO LACTICO

proteico. Se utilizó el análisis de varianza Oneway para una probabilidad del 95% y, en los casos en que se presentaron diferencias significativas, se aplicó la prueba Duncan de rango múltiple y contrastes.

En todos los medios suplementados se observó una disminución importante en el pH. (de un valor inicial promedio de 6.4 a uno final de 3.7), excepto en el que se adicionó ácido láctico, en donde desde un principio se encontraba en 4.2, mientras que en el control el pH descendió en menor medida, de 7.1 a 5.5 (Tabla 3.4). El contenido de acidez titulable aumentó significativamente en todos los medios suplementados, llegando hasta aproximadamente un 2% de ácido láctico, siendo este aumento mucho menor en el control (de 0.1 a 1.0%) (Tabla 3.4). La adición de yogurt o sus componentes favorecen la fermentación láctica, pues los medios se inoculan con microorganismos lácticos, además de los factores de crecimiento antes mencionados que contiene el yogurt.

Se presentó un incremento mayor en el contenido de proteína cruda en el control (de 9.3 a 12%) y en los medios suplementados con suero estéril (de 9.5 a 13.2%) y viable (de 10.3 a 12.7%) y en el que contenía yogurt viable (de 10.6 a 12.8%), (Tabla 3.5, Figura 3.7).

No se observaron diferencias significativas en el contenido neto proteico entre las masas suplementadas con yogurt y

suero, ni entre las suplementadas con yogurt viable y estéril, mientras que dicho incremento fue mayor al adicionar ácido láctico (de 5.3 a 7.8%) que al adicionar yogurt o suero viables y estériles (Tabla 3.5, Figura 3.8). Sólomente en los medios suplementados con ácido láctico el aumento fue similar al del control (de 5.3 a 7.8% y de 6.1 a 8.2%, respectivamente). Esto parece indicar que es este ácido el que favorece la fijación de nitrógeno. Muñoz y Viniegra (1981) estudiaron ésta con un cultivo mixto de una bacteria láctica y una fijadora de nitrógeno, observando una cantidad de nitrógeno fijada mucho mayor con la mezcla que con el microorganismos fijador sólo. Además, encontraron que el lactato de calcio y de litio eran mejores fuentes de carbono que la glucosa para el crecimiento del fijador de nitrógeno.

3.3 EFECTO DE LA NIXTAMALIZACION EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.

En trabajos previos (Alvarez y López, 1987) se determinó un efecto positivo de la nixtamalización sobre el aumento en el contenido proteico en la fermentación del pozol. Para evaluar si la causa de este efecto es la adición de calcio o los cambios que ocurren en el maíz, provocados por el proceso de nixtamalización, se realizó un experimento en el que se fermentaron medios de masa de maíz nixtamalizado, de maíz cocido y de maíz cocido al que se le añadió posteriormente un 0.25% de cal. (Tabla 3.6).

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.7. Se aplicó el análisis de varianza Oneway, para una probabilidad de 95%.

La disminución en el valor del pH fue mayor en los medios de maíz cocido al que posteriormente se le añadió cal (de 9.1 a 4.5). La disminución menor la presentó el medio de maíz cocido (de 6.5 a 4.0). (Tabla 3.7). No se presentaron diferencias significativas en el aumento en el contenido de acidez titulable entre los medios estudiados, que alcanzaron valores entre 0.4 y 0.9%, (Tabla 3.7), lo que indica que la adición de calcio no afecta la fermentación láctica.

Respecto al aumento en el contenido de proteína cruda se pudo observar que éste fue mayor en los medios de maíz nixtamalizado (de 10.8 a 13.1%) y de maíz cocido (de 10.2 a 13.1%) que en los de maíz cocido con adición posterior de cal (de 9.1 a 9.7%). (Tabla 3.7 y Figura 3.9). Sin embargo, el aumento en el contenido neto proteico fue mayor en medios de maíz nixtamalizado (de 7 a 9.3%), que en el de maíz cocido con adición posterior de cal (de 6 a 6.9%), mientras que en el medio de maíz cocido se presentó un decremento en dicho contenido (de 10.4 a 9.9%). (Tabla 3.7 y Figura 3.10). Aparentemente, la cal presenta un efecto positivo sobre la fijación de nitrógeno. Esto se debe, tal vez, a que la cal eleva el pH, neutralizando el ácido láctico al formarse

Tabla 3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.

MEDIO	TRATAMIENTO DEL MAIZ
1	nixtamalización
2	cocción
3	cocción con posterior adición de cal

Tabla 3.7 EFECTO DE LA NIXTAMALIZACION EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.

PARAMETROS	MEDIOS					
	Masa de maiz nixtamalizado		masa de maiz cocido		masa de maiz cocido + cal	
TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)	8	9	8	9	8	9
HUMEDAD (1)	61.0 [±] 0.4	47.0 [±] 0.8 ab	61.0 [±] 4.0	47.0 [±] 1.0 b	65.0 [±] 5.0	52.0 [±] 1.0 a
pH	9.0 [±] 0.0	5.0 [±] 0.0 b	6.5 [±] 0.0	4.0 [±] 0.0 c	9.1 [±] 0.0	4.5 [±] 0.0 a
ACIDEZ TITULABLE (2)	0.0 [±] 0.0	0.4 [±] 0.1 a	0.1 [±] 0.0	0.7 [±] 0.2 a	0.0 [±] 0.0	0.9 [±] 0.0 a
PROTEINA CRUDA (3)	10.6 [±] 0.5	13.1 [±] 0.0 a	10.2 [±] 0.0	13.1 [±] 0.0 a	9.1 [±] 0.6	9.7 [±] 0.7 b
CENIZAS (3)	1.5 [±] 0.1	1.4 [±] 0.1 a	1.0 [±] 0.1	1.3 [±] 0.1 b	1.5 [±] 0.1	1.4 [±] 0.1 a
CONTENIDO NETO PROTEICO (4)	7.0 [±] 0.3	9.3 [±] 0.0 a	10.4 [±] 0.0	9.9 [±] 0.0 c	6.0 [±] 0.4	6.9 [±] 0.5 b

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. láctico/100g muestra húmeda.

(3) g/100g muestra seca.

(4) g proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre los diversos tratamientos del maíz.

FIG.3.9 EFECTO DE LA NIXTAMALIZACION SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.

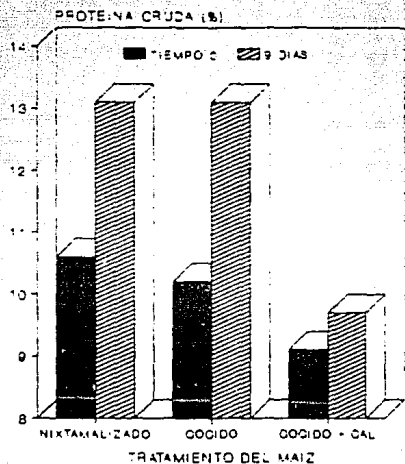
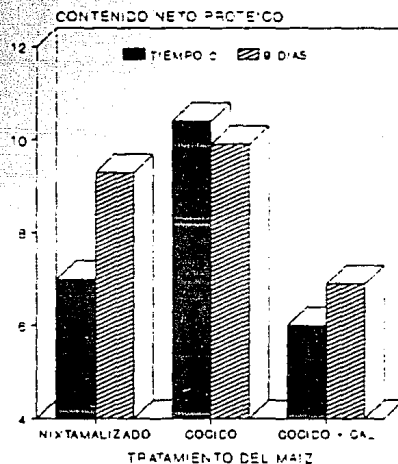


FIG.3.10 EFECTO DE LA NIXTAMALIZACION SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ



lactato de calcio, el cual es una buena fuente de carbono para los microorganismos fijadores de nitrógeno, debido a que puede proporcionar un mejor balance de NAD reducido por cada ATP que la glucosa (Muñoz y Viniegra, 1981). Por otra parte, se sabe que algunos de estos microorganismos, como los *Azotobacter*, necesitan calcio para fijar nitrógeno (Mulder, 1975). Sin embargo, la sola presencia del calcio no es la única causa del incremento neto proteico observado, sino que también son importantes los cambios en la proteína del maíz y la hidrólisis del almidón, provocados por la nixtamalización, ya que el incremento neto proteico fue superior en el maíz nixtamalizado que al añadirle cal al maíz cocido (Tovar, 1981).

3.4 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA.

Alvarez y López (1987) observaron en suspensiones diluidas de masa de maíz nixtamalizado que cuanto mayor es el contenido inicial de proteína, también es mayor el contenido final, lo que podría ser explicado por una mayor producción de biomasa. Debido a esto, se decidió estudiar este efecto en masas fermentadas en la forma esférica tradicional. Para ello, se adicionaron diversas cantidades de caseína, hasta obtener concentraciones iniciales de proteína cruda de 22, 28.5, 33.5 y 46%. (Tabla 3.8), que son concentraciones mayores a las estudiadas por Alvarez y López (1987). Por otra parte, Viniegra y Gómez (1982) reportaron que relaciones

carbono/nitrógeno menores a 2.3 favorecen la fermentación láctica y, como se ha indicado anteriormente, ésta favorece, a su vez, la fijación de nitrógeno en el pozol.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.9 y fueron analizados estadísticamente por medio del análisis Oneway y, en los casos en que se presentaron diferencias significativas, se aplicó la prueba Duncan de rango múltiple ($P < 0.05$).

Se observó que el valor del pH disminuyó menos en los medios a los que se había adicionado mayor cantidad de caseína, llegando incluso a permanecer sin cambios en el medio con un contenido inicial de proteína de 46%. (Tabla 3.9). El aumento de acidez titulable fue mayor en todos los medios con altos contenidos iniciales de proteína, de 28.5 a 46%, en donde se incrementó de 0.6 a 1.0 hasta valores finales de 2.1 a 3.0% láctico. (Tabla 3.9). Probablemente esto se debió a que las fuentes de nitrógeno proteicas favorecen el crecimiento de microorganismos lácticos (Gómez, 1983). Por otro lado, las propiedades amortiguadoras de la caseína previnieron una mayor disminución en el valor del pH, ya que el contenido de acidez titulable siempre aumento, (Lehninger, 1978).

Respecto al contenido de proteína cruda, se observó una tendencia a aumentar, conforme mayor era el contenido inicial, lo cual podría ser utilizado para incrementar el contenido proteico de alimentos para animales monogástricos, ya que

Tabla 3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA.

MEDIO	CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA (%)
CONTROL	18.6
1	22.1
2	28.5
3	33.7
4	46.8

Tabla 3.9 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA.

PARAMETROS	MEDIO									
	MAIZ		MAIZ Y CASEINA							
PROTEINA INICIAL (1)	18.6		22.1		28.6		33.7		46.8	
TIEMPO DE FERMENTACION (DÍAS)	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9
HUMEDAD (2)	61.8 ^a 4.8	47.8 ^b 0.8	57.8 ^a 1.8	49.8 ^a 4.8	64.8 ^c 5.8	45.8 ^c 0.8	57.8 ^a 5.8	58.8 ^a 0.8	58.8 ^a 0.4	58.8 ^a 1.8
pH	9.8 ^a 0.8	5.8 ^a 0.8	5.5 ^b 0.8	3.6 ^b 0.8	6.8 ^c 0.8	4.5 ^c 0.8	5.5 ^d 0.8	5.8 ^d 0.8	5.5 ^e 0.8	5.5 ^e 0.8
AC. TITULABLE (3)	0.8 ^a 0.8	0.4 ^a 0.1	0.2 ^b 0.8	1.6 ^b 0.1	0.6 ^{bcd} 0.8	2.3 ^c 0.3	0.7 ^{bc} 0.8	2.1 ^c 0.1	1.8 ^d 0.1	3.8 ^d 0.5
PROTEINA CRUDA (1)	18.6 ^a 0.5	13.1 ^a 0.8	22.1 ^a 0.5	27.1 ^a 0.9	28.6 ^b 0.7	40.8 ^b 2.5	33.7 ^c 0.8	51.8 ^c 2.5	46.8 ^d 1.2	71.5 ^d 2.5
CENIZAS (1)	1.5 ^a 0.1	1.4 ^a 0.1	1.7 ^b 0.8	1.8 ^b 0.8	1.5 ^b 0.1	1.7 ^b 0.1	1.8 ^c 0.8	2.8 ^c 0.8	1.7 ^d 0.1	2.5 ^d 0.2
CONT. NETO (4)	7.8 ^b 0.3	9.3 ^b 0.8	13.8 ^a 0.3	14.8 ^a 0.5	19.8 ^c 0.5	23.5 ^c 1.5	19.8 ^d 0.5	25.5 ^d 1.3	26.9 ^b 0.7	28.9 ^b 1.8

(1) g/100g muestra seca.

(2) g/100g muestra húmeda.

(3) g Ac. lactico/100g muestra húmeda.

(4) g proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.11 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON CASEINA.

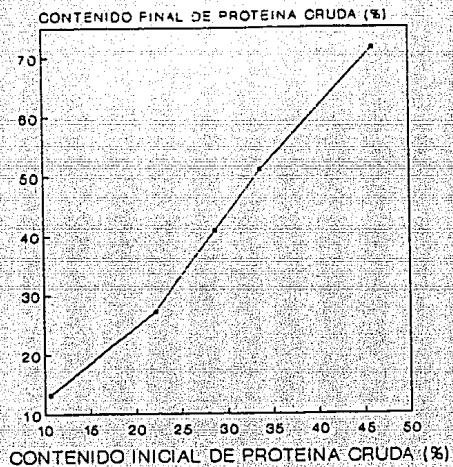
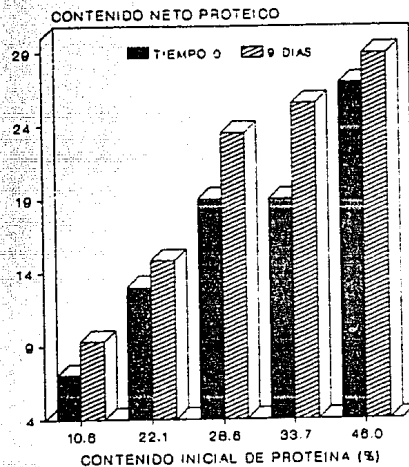


FIG.3.12 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON CASEINA.



añadiendo pequeñas cantidades de proteína se obtienen incrementos considerables en el contenido de ésta. No se presentaron diferencias significativas entre los aumentos en el contenido de proteína de los medios con un contenido inicial de 22% y el control (de 22.1 a 27.1% y de 10.8 a 13.1%, respectivamente). (Tabla 3.9 y Figura 3.11).

Únicamente el medio con 33.7% de proteína inicial presentó un mayor aumento en el contenido neto proteico que el control (de 19.1 a 25.5% de contenido neto proteico), mientras que en el medio con un 22.1% el aumento fue muy pequeño (de 13 a 14.8%). (Tabla 3.9 y Figura 3.12). Esto parece indicar que la caseína influye positivamente sobre la producción de proteína por ser una proteína de buena calidad con un buen balance de aminoácidos, produciéndose una mayor cantidad de biomasa, que posteriormente puede haber asimilado el nitrógeno fijado por *Agrobacterium azotophilum*.

3.5 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO.

Con el fin de determinar cuáles son las fuentes de nitrógeno proteico más apropiadas para producir mayores aumentos en los niveles de proteína en la fermentación del pozol, se suplementaron masas de maíz nixtamalizado con caseína, gluten de maíz, harina de pescado y harina de soya, hasta un nivel de contenido inicial de proteína de aproximadamente 21%, que es

el valor que Alvarez y López (1987) encontraron favorable para el aumento de dicho contenido (Tabla 3.10). Estas fuentes se eligieron debido a que la caseína, la harina de soya y la de pescado son todas ellas fuentes proteicas de alto valor biológico, siendo las dos últimas más baratas que la primera, mientras que el gluten de maíz está presente en el medio natural de la microflora del pozol.

Los resultados se analizaron por medio del método de análisis estadístico Oneway y la prueba Duncan de rango múltiple ($P < 0.05$) y se presentan en la Tabla 3.11.

Se observó que el valor del pH descendió hasta 3.6 en el medio con caseína, mientras que en el medio suplementado con harina de pescado el valor del pH permaneció sin cambio y en el resto de los medios se obtuvieron valores finales de aproximadamente 3.6 a 4.8 (Tabla 3.11). De todos Los medios, los suplementados con caseína o harina de soya presentaron un mayor aumento en el contenido de acidez titulable, de 0.2 a 1.6 y de 0.5 a 1.5%, respectivamente. (Tabla 3.11), lo que indica que estas fuentes de nitrógeno favorecen más la fermentación láctica.

La suplementación nitrogenada que provocó un mayor incremento en el contenido de proteína fue la de harina de pescado, de 21.3 a 35%, tal vez debido a su balance de aminoácidos y/o a otros componentes, como minerales, (Tabla 3.12) requeridos por los microorganismos fijadores de nitrógeno o por otros

Tabla 3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO.

MEDIO	FUENTE DE NITROGENO
1	-----
2	CASEINA
3	GLUTEN DE MAIZ
4	HARINA DE PESCADO
5	HARINA DE SOYA

Tabla 3.11 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO.

PARAMETROS	MEDIOS									
	MAIZ		MAIZ Y CASEINA		MAIZ Y GLUTEN		MAIZ Y H. DE PESCADO		MAIZ Y H. DE SOYA	
TIEMPO DE FERMENTACION (días)	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9
HUMEDAD (1)	61.0 ^a 4.8	47.8 ^c 0.0	57.8 ^a 1.0	49.0 ^b 4.0	55.8 ^a 2.0	51.8 ^a 2.0	56.8 ^a 2.8	46.8 ^{bc} 1.0	59.8 ^a 0.0	48.0 ^{bc} 0.0
pH	9.8 ^a 0.0	5.0 ^e 0.0	5.5 ^c 0.0	3.6 ^c 0.0	5.5 ^b 0.0	4.5 ^b 0.0	7.0 ^a 0.0	7.0 ^a 0.0	7.1 ^d 0.0	4.8 ^d 0.0
AC. TITULABLE (2)	0.0 ^a 0.0	0.4 ^a 0.1	0.2 ^b 0.0	1.6 ^b 0.1	0.9 ^a 0.1	1.9 ^a 0.1	0.4 ^a 0.0	0.8 ^a 0.1	0.5 ^b 0.0	1.5 ^b 0.2
PROTEINA CRUDA(3)	10.6 ^b 0.5	13.1 ^a 0.0	22.1 ^b 0.5	27.1 ^b 0.9	21.2 ^c 1.2	32.1 ^c 2.5	21.3 ^d 1.6	35.0 ^d 0.0	25.6 ^a 0.0	21.5 ^a 0.3
CENIZAS (3)	1.5 ^a 0.1	1.4 ^a 0.1	1.7 ^b 0.0	1.8 ^b 0.0	3.2 ^c 0.1	3.8 ^c 0.1	4.9 ^c 0.2	6.8 ^d 0.2	3.4 ^b 0.1	3.5 ^b 0.1
CONT. NETO PROTEICO(4)	7.0 ^c 0.3	9.3 ^c 0.0	13.0 ^a 0.3	14.8 ^a 0.5	6.6 ^b 0.3	8.5 ^b 0.7	4.4 ^a 0.3	5.9 ^{bc} 0.0	7.0 ^a 0.3	6.2 ^a 0.1

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. láctico/100g muestra húmeda.

(3) g/100g muestra seca.

(4) g proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.13 EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.

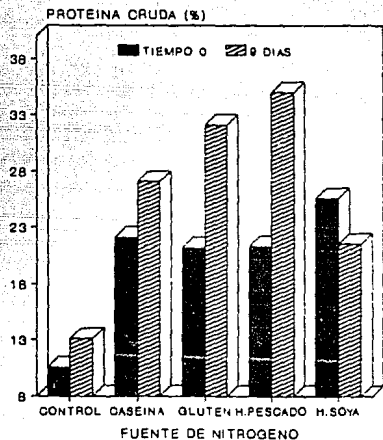
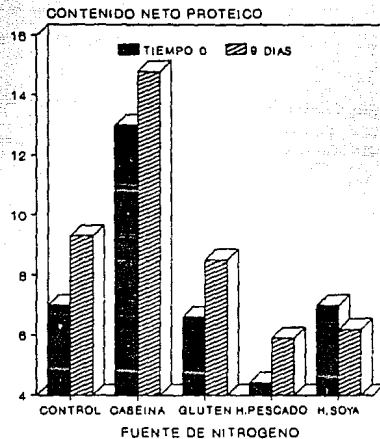


FIG.3.14 EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.



microorganismos presentes que pueden favorecer la fijación de nitrógeno. Con harina de soya se presentó una disminución en el contenido proteico (de 25.6 a 21.5%). (Tabla 3.11 y Figura 3.13). No se presentaron diferencias significativas en el aumento del contenido neto proteico entre el control (de 7 a 9.2%) y los medios suplementados con harina de pescado (de 4.4 a 5.9%). Cuando se suplementó con caseína el aumento fue muy pequeño (de 13 a 14.8%), mientras que con harina de soya se presentó una disminución (de 7 a 6.2%). (Tabla 3.11 y Figura 3.14). La inhibición de la fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol provocada por esta fuente de nitrógeno es probablemente debida a los factores antinutricionales presentes en la soya, como son los inhibidores de tripsina y las saponinas, las cuales está demostrado que inhiben varias enzimas en los organismos superiores (Wolf y Cowan, 1975). Sin embargo, el efecto de estos factores no ha sido estudiado en los microorganismos fijadores de nitrógeno del pozol. Además, es posible que se haya presentado un crecimiento de microorganismos desnitrificantes, convirtiendo las proteínas en N_2 o NO , por lo que hubo una pérdida de nitrógeno en el medio (Sánchez, 1988).

Tabla 3.12 COMPOSICION QUIMICA DE LAS FUENTES DE NITROGENO UTILIZADAS.

Fuente proteica	Proteina (%)	Grasa (%)	Minerales (%)
Caseína (1)	98.4	---	1.6
Harina de pescado (2)	66.1	9.7	2.1
Harina de soya (3)	56.0	1.0	6.0
Gluten de maíz (3)	26.7	4.2	8.0

(1) Alais, 1981.

(2) Windsor y Barlow, 1984.

(3) Milner *et al.*, 1978.

3.6 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO A DIFERENTES CONTENIDOS INICIALES DE PROTEINA.

Este experimento se realizó con el fin de determinar el contenido inicial de proteína para cada fuente de nitrógeno que más favorecen a la fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol. Se utilizaron cuatro fuentes de nitrógeno diferentes: caseína, harina de soya, harina de pescado y gluten de maíz, añadiéndolas hasta obtener diferentes contenidos iniciales de proteína Centre 13 y 26%,

ya que por razones económicas sería preferible utilizar cantidades pequeñas de estas proteínas.

El diseño experimental utilizado se presenta en la Tabla 3.13 y los resultados en las Tablas 3.14 y 3.15. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio del análisis de varianza Oneway, realizándose pruebas de rango múltiple Duncan y contrastes en los casos en que se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$).

El pH disminuyó en los medios suplementados con caseína hasta un valor de 4.2-4.0, observándose que el valor inicial fue menor al aumentar la cantidad de caseína añadida, debido al carácter ácido de ésta. El descenso en el pH fue ligeramente menor tanto en los medios con harina de soya como en los suplementados con harina de pescado. (Tabla 3.14). Las masas suplementadas con gluten de maíz presentaron un decremento en el pH cuando el contenido inicial de proteína fue menor a 24%, mientras que con 24 y 26% hubo un aumento, indicando la posibilidad de una proteólisis a niveles altos de gluten (Tabla 3.14).

El aumento en el contenido de acidez titulable fue muy similar en los medios suplementados con caseína, harina de pescado y gluten de maíz, alcanzando valores de aproximadamente 3.5% de ácido láctico. En los medios con harina de soya se observaron los menores aumentos, alcanzándose un máximo de 2.8%. (Tabla

Tabla 3.13 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO A DIVERSOS CONTENIDOS INICIALES DE PROTEINA.

MEDIO	FUENTE DE NITROGENO	CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA (%)
1.1	---	9.8
2.1	CASEINA	14.8
2.2		17.8
2.3		28.5
2.4		24.8
2.5		25.8
3.1	HARINA DE SOYA	13.8
3.2		16.8
3.3		17.5
3.4		22.8
3.5		23.5
4.1	HARINA DE PESCADO	13.5
4.2		17.5
4.3		19.8
4.4		21.5
4.5		24.5
5.1	GLUTEN DE MAIZ	14.5
5.2		17.8
5.3		21.8
5.4		24.8
5.5		26.8

Tabla 3.14 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO A DIVERSOS CONTENIDOS INICIALES DE PROTEINA.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS									
	PROTEINA CRUDA (1)	HUMEDAD (2)		pH		AC. TITULABLE (3)				
	Tiempo de fermentación (Días)	Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)				
	0	0	9	0	9	0	9			
CONTROL	9.0	52.0 ¹ 5.5	56.0 ¹ 5.5	efg	8.1 ¹ 0.1	4.5 ¹ 0.1	ab	0.1 ¹ 0.0	0.5 ¹ 0.1	
CASEINA	14.0	53.0 ¹ 5.5	54.5 ¹ 0.5	bdef	7.7 ¹ 0.1	4.1 ¹ 0.0	a	0.1 ¹ 0.0	1.0 ¹ 0.2	bcde
	17.0	52.0 ¹ 0.5	58.0 ¹ 3.5	fg	6.0 ¹ 0.1	4.1 ¹ 0.0	gh	0.1 ¹ 0.0	3.0 ¹ 0.1	fghi
	20.5	52.5 ¹ 1.0	51.5 ¹ 2.5	abcd	5.7 ¹ 0.1	4.0 ¹ 0.0	h	0.1 ¹ 0.0	3.6 ¹ 0.1	jk
	24.0	53.0 ¹ 1.0	54.5 ¹ 1.5	bdef	5.4 ¹ 0.0	4.1 ¹ 0.0	i	0.1 ¹ 0.0	3.6 ¹ 0.1	jk
	25.0	53.0 ¹ 0.5	52.0 ¹ 1.5	abcd	5.3 ¹ 0.1	4.2 ¹ 0.0	i	0.1 ¹ 0.0	3.6 ¹ 0.1	jk
HARINA DE SOYA	13.0	50.0 ¹ 1.5	54.0 ¹ 1.5	efg	7.7 ¹ 0.1	4.5 ¹ 0.2	cd	0.1 ¹ 0.0	1.2 ¹ 0.1	b
	16.0	50.5 ¹ 4.0	54.5 ¹ 0.5	efg	8.0 ¹ 0.2	4.6 ¹ 0.1	bc	0.1 ¹ 0.0	2.3 ¹ 0.2	fgh
	17.5	53.0 ¹ 1.5	53.5 ¹ 1.5	bcd	7.2 ¹ 0.1	4.2 ¹ 0.1	d	0.1 ¹ 0.0	2.7 ¹ 0.1	hi
	22.0	52.0 ¹ 0.5	56.0 ¹ 3.0	efg	6.9 ¹ 0.0	4.2 ¹ 0.1	e	0.2 ¹ 0.0	2.0 ¹ 0.2	hi
	23.5	53.5 ¹ 1.0	53.5 ¹ 1.5	cdefg	6.7 ¹ 0.1	4.7 ¹ 0.1	g	0.2 ¹ 0.0	2.0 ¹ 0.0	hi
HARINA DE PESCADO	13.5	52.0 ¹ 2.0	52.5 ¹ 2.5	ab	8.0 ¹ 0.1	4.5 ¹ 0.0	ab	0.1 ¹ 0.0	1.9 ¹ 0.1	cdef
	17.5	54.5 ¹ 0.5	53.0 ¹ 3.5	abc	7.5 ¹ 0.1	4.4 ¹ 0.0	d	0.3 ¹ 0.1	3.6 ¹ 0.5	jk
	19.0	54.5 ¹ 0.5	52.0 ¹ 1.0	abc	6.7 ¹ 0.1	4.4 ¹ 0.1	f	0.4 ¹ 0.1	3.6 ¹ 0.2	jk
	21.5	53.0 ¹ 2.0	51.5 ¹ 0.0	a	6.5 ¹ 0.1	4.7 ¹ 0.1	h	0.5 ¹ 0.1	3.0 ¹ 0.3	jk
	24.5	54.0 ¹ 1.0	52.0 ¹ 2.5	cdefg	6.6 ¹ 0.0	4.7 ¹ 0.1	g	0.4 ¹ 0.0	3.6 ¹ 0.9	l
GLUTEN DE MAIZ	14.5	49.5 ¹ 0.5	51.5 ¹ 1.0	bdef	7.1 ¹ 0.0	4.7 ¹ 0.1	f	0.1 ¹ 0.0	2.1 ¹ 0.2	defg
	17.0	50.0 ¹ 2.5	51.5 ¹ 1.5	bcd	6.3 ¹ 0.2	5.0 ¹ 0.0	i	0.3 ¹ 0.0	2.3 ¹ 0.1	bcd
	21.0	51.0 ¹ 0.0	56.0 ¹ 3.5	g	6.0 ¹ 0.1	5.2 ¹ 0.2	j	0.4 ¹ 0.0	2.3 ¹ 0.2	defg
	24.0	50.0 ¹ 1.5	51.5 ¹ 2.5	defg	5.0 ¹ 0.1	6.5 ¹ 0.4	k	0.7 ¹ 0.0	2.0 ¹ 0.1	bc
	26.0	48.5 ¹ 3.0	53.5 ¹ 2.5	efg	5.9 ¹ 0.1	0.5 ¹ 0.3	l	0.9 ¹ 0.1	3.0 ¹ 0.0	ghi

(1) g proteína cruda/100g muestra seca.

(2) y agua/100g muestra húmeda.

(3) y Ac. lactico/100g muestra húmeda.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

Tabla 3.15. EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO A DIVERSOS CONTENIDOS INICIALES DE PROTEINA.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	PROTEINA CRUDA (1)		CENIZAS (1)		CONTENIDO NETO PROTEICO (2)	
	Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)	
	0	9	0	9		
CONTROL	9.8 ^a 0.2	13.4 ^b 1.3 ef	1.3 ^a 0.1	1.6 ^a 0.1 d	6.8 ^a 0.2	8.3 ^a 0.8 h
CASEINA	13.8 ^a 0.7	16.6 ^b 0.8 de	1.4 ^a 0.1	1.7 ^a 0.1 d	9.7 ^a 0.5	10.8 ^a 0.8 efg
	16.8 ^a 0.8	23.1 ^b 0.8 gh	1.3 ^a 0.1	1.8 ^a 0.1 f	12.6 ^a 0.8	12.8 ^a 0.8 h
	20.7 ^a 0.9	22.4 ^b 0.8 cd	1.3 ^a 0.1	1.6 ^a 0.1 d	15.9 ^a 0.8	13.7 ^a 0.8 a
	23.8 ^a 0.8	25.9 ^b 0.8 cd	1.6 ^a 0.1	1.6 ^a 0.1 c	15.4 ^a 0.8	15.8 ^a 0.8 fgh
	25.8 ^a 0.8	30.3 ^b 0.8 fgh	1.7 ^a 0.1	1.5 ^a 0.1 c	14.5 ^a 0.8	20.9 ^a 0.8 k
HARINA DE SOYA	12.7 ^a 0.2	14.7 ^a 0.3 cd	1.8 ^a 0.1	1.9 ^a 0.1 c	7.2 ^a 0.1	7.9 ^a 0.2 gh
	15.9 ^a 0.8	17.3 ^a 0.8 bcd	1.9 ^a 0.8	2.3 ^a 0.2 e	8.3 ^a 0.8	7.5 ^a 0.8 bc
	17.3 ^a 0.2	20.1 ^a 1.3 de	2.7 ^a 0.1	3.0 ^a 0.1 d	6.5 ^a 0.1	6.8 ^a 0.4 defg
	21.7 ^a 0.3	22.1 ^a 1.8 abc	3.1 ^a 0.1	3.3 ^a 0.1 c	7.1 ^a 0.1	6.8 ^a 0.6 bcd
	23.3 ^a 0.8	27.7 ^a 0.8 ef	3.4 ^a 0.1	3.8 ^a 0.2 d	7.8 ^a 0.8	7.4 ^a 0.8 fgh
HARINA DE PESCADO	13.4 ^a 1.8	13.4 ^a 1.3 ab	2.7 ^a 0.3	2.3 ^a 0.8 b	5.1 ^a 0.6	5.7 ^a 0.6 gh
	17.4 ^a 1.6	17.2 ^a 8.9 ab	3.1 ^a 0.2	3.4 ^a 0.8 d	5.6 ^a 0.5	5.1 ^a 0.3 bc
	19.1 ^a 0.8	25.8 ^a 0.8 fgh	4.8 ^a 0.3	5.5 ^a 0.3 g	4.8 ^a 0.8	4.6 ^a 0.8 bcde
	21.6 ^a 2.1	32.9 ^a 0.9 i	4.5 ^a 0.8	4.4 ^a 0.1 c	4.8 ^a 0.5	7.4 ^a 0.2 j
	24.4 ^a 0.8	23.3 ^a 1.9 a	5.2 ^a 0.2	3.7 ^a 0.3 a	4.7 ^a 0.2	6.2 ^a 0.4 i
GLUTEN DE MAIZ	14.5 ^a 1.8	16.9 ^a 0.5 d	1.8 ^a 0.1	2.2 ^a 0.2 d	7.9 ^a 0.5	7.8 ^a 0.2 cdef
	16.8 ^a 0.8	23.3 ^a 1.8 h	2.6 ^a 0.1	2.8 ^a 0.1 c	6.6 ^a 0.8	8.3 ^a 0.6 i
	20.8 ^a 1.4	23.3 ^a 1.8 d	2.4 ^a 0.1	3.5 ^a 0.1 g	8.5 ^a 0.5	6.8 ^a 0.5 a
	24.8 ^a 0.8	28.5 ^a 0.8 fg	3.1 ^a 0.2	3.8 ^a 0.3 e	7.8 ^a 0.8	7.6 ^a 0.8 bcde
	26.1 ^a 0.6	32.8 ^a 0.8 fgh	3.3 ^a 0.1	4.4 ^a 0.1 g	8.8 ^a 0.2	7.3 ^a 0.8 b

(1) g/100g muestra seca.

(2) g proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.15 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO FINAL EN LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO

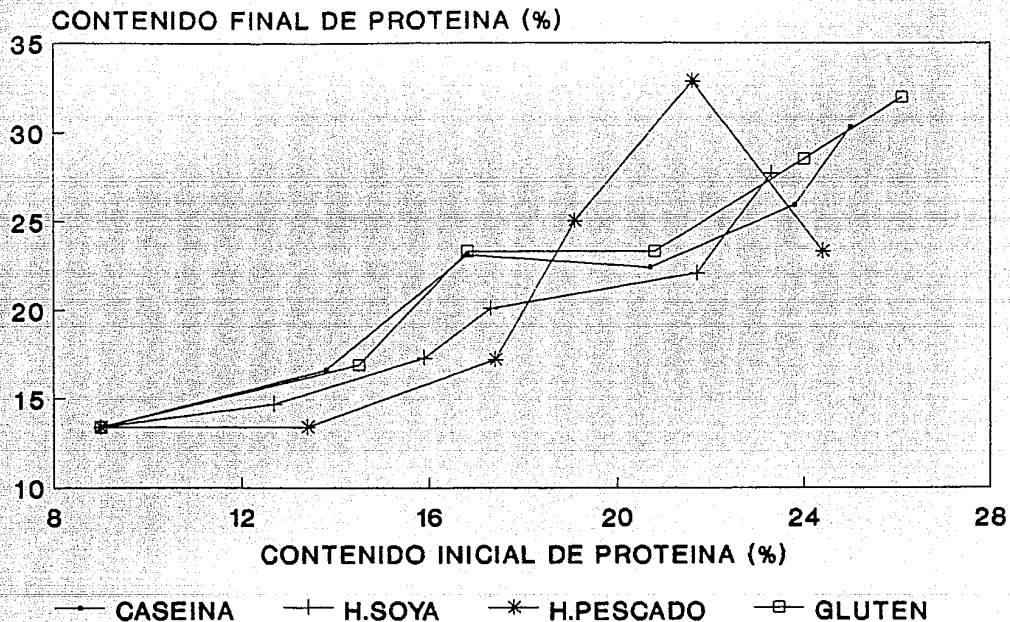


FIG.3.16 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA.

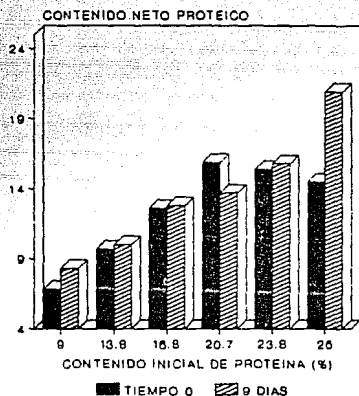


FIG.3.17 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON HARINA DE SOYA

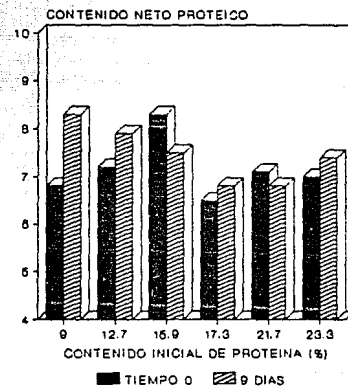


FIG.3.18 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON HARINA DE PESCADO.

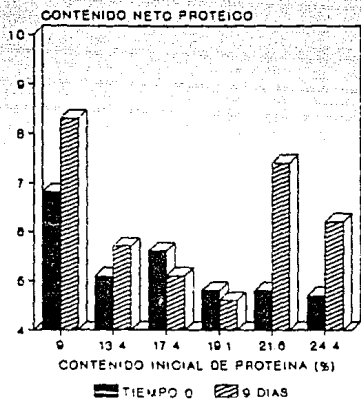
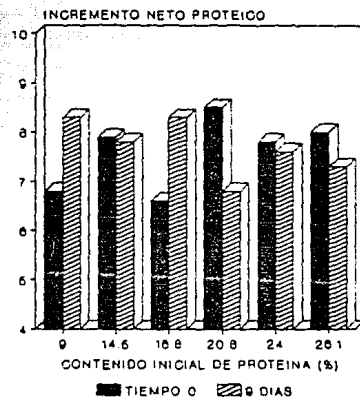


FIG.3.19 EFECTO DEL CONTENIDO INICIAL DE PROTEINA SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON GLUTEN DE MAIZ



3.14), debido probablemente a los factores antinutricionales antes mencionados, que también podrían haber afectado a los microorganismos lácticos. En general, a mayor contenido de proteína el aumento en la acidez titulable fue mayor con todas las fuentes de nitrógeno, lo que podría ser explicado por el hecho de que la fermentación láctica es favorecida por la presencia de proteína (Gómez, 1983), debido a que las bacterias lácticas presentan requerimientos nutricionales complejos (Rose, 1977).

Los medios suplementados con harina de pescado y gluten de maíz alcanzaron los valores más altos en el contenido de proteína cruda, 32.9 y 32.0 a partir de un contenido inicial de 21.6 y 26.1, respectivamente. Los suplementados con caseína alcanzaron un valor máximo de 30.3%, partiendo de un contenido inicial de 25.0%, mientras que los suplementados con harina de soya presentaron los menores incrementos, alcanzando un valor máximo de 27.7 a partir de 23.3%. (Tabla 3.15 y Figura 3.15).

Los medios donde el contenido neto proteico se incrementó en una mayor proporción que en el control (de 6.8 a 8.3%) fueron los suplementados con caseína a un 25.0% de contenido inicial de proteína cruda (de 14.5 a 20.9%), con harina de pescado a contenidos iniciales de proteína cruda de 21.6 y 24.4% (de 4.8 a 7.4 y de 4.7 a 6.2%, respectivamente) y el medio con gluten de maíz con un contenido proteico inicial de 16.8% (de 6.6 a 8.3%). (Tabla 3.15 y Figuras 3.16 a 3.19), lo que parece

indicar que en concentraciones altas ésta no es una buena fuente de nitrógeno para la fijación en el pozol. Al no estar nixtamalizado el gluten de maíz la disponibilidad de los aminoácidos en él es muy baja (Tovar, 1981), lo que podría afectar el crecimiento de los microorganismos no fijadores que favorecen el crecimiento de los fijadores de nitrógeno. El hecho de que al añadir algunas proteínas al medio no se haya inhibido la fijación de nitrógeno sino, por el contrario, se haya favorecido, se debe a que en el pozol se presenta una sucesión de microorganismos. Las que crecen en primer término son las bacterias lácticas (Aguilera, 1989). Estas bacterias requieren de fuentes proteicas para su crecimiento, siendo además favorecida la fermentación láctica con relaciones C/N menores a 30 (Gómez, 1983). Como ya se ha mencionado, la producción de ácido láctico favorece la fijación de nitrógeno en el pozol, por lo que el efecto positivo de la adición de proteína sobre este fenómeno es indirecto.

3.7 FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES.

En los últimos experimentos se corroboró que el nivel inicial de proteína influye sobre el contenido final de ésta. En vista de ello, se creyó conveniente evaluar si este efecto se presentaba también al fermentar masa suplementada con yogurt, pues sin la adición de una fuente proteica no se corroboraron

los resultados obtenidos por Alvarez y López (1987). Para ello se prepararon medios de masa de maíz nixtamalizado suplementados con caseína a una concentración inicial de proteína de aproximadamente 25%. Se preparó, adicionalmente, un medio suplementado con harina de pescado, debido a que esta fuente nitrogenada también produjo un notable incremento neto proteico en el experimento anterior. Unos medios se suplementaron con yogurt y otros con suero de yogurt, ambos en forma viable y estéril.

Se analizaron los resultados por medio del análisis de varianza Oneway con una probabilidad del 95% y contrastes. El diseño experimental utilizado se presenta en la Tabla 3.16 y los resultados en las Tablas 3.17 y 3.18.

El valor del pH disminuyó en todos los medios hasta valores entre 4.2 y 4.8, excepto en el suplementado con caseína y yogurt viable, donde no se presentó un cambio significativo. (Tabla 3.17). En todos los medios el contenido de acidez titulable aumentó hasta valores entre 3 y 4%, lo que indica que se favoreció la fermentación láctica. En el medio con harina de pescado y yogurt en el que se alcanzó sólo un 2.3%. (Tabla 3.17). Esto podría ser debido a que la caseína y la harina de pescado presentan balances diferentes de aminoácidos y/o a que en la preparación de esta última se utilizan altas temperaturas, lo que puede provocar una desnaturalización de la proteína (Schultz *et al.*, 1962), lo que podría afectar el

Tabla 3.16 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT Y SUS COMPONENTES.

MEDIO	SUPLEMENTACION					
	MAIZ (%)	FUENTE DE NITROGENO	YOGURT VIABLE (%)	YOGURT ESTERIL (%)	SUERO VIABLE (%)	SUERO ESTERIL (%)
1	100	CASEINA	---	---	---	---
2	90	CASEINA	10	---	---	---
3	90	CASEINA	---	10	---	---
4	90	CASEINA	---	---	10	---
5	90	CASEINA	---	---	---	10
6	90	H. PESCADO	10	---	---	---

Tabla 3.17 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	HUMEDAD (1)		pH		AC. TITULABLE (2)	
	Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)	
	8	9	8	9	8	9
CONTROL	53.5+ 0.5-	50.5+ 2.0 a	5.2+ 0.1-	4.8+ 0.4 b	0.2+ 0.0-	3.9+ 0.2 c
YOGURT VIABLE	51.5+ 0.5-	56.5+ 1.5 d	5.1+ 0.1-	5.5+ 0.6 a	0.4+ 0.1-	3.3+ 0.3 b
YOGURT ESTERIL	53.5+ 1.5-	55.0+ 0.5 bc	5.1+ 0.1-	4.5+ 0.2 bc	0.4+ 0.0-	3.5+ 0.4 d
SUERO VIABLE	54.5+ 2.5-	53.5+ 1.5 ab	5.2+ 0.1-	4.2+ 0.0 cd	0.4+ 0.0-	4.1+ 0.1 c
SUERO ESTERIL	50.0+ 0.0-	54.5+ 3.0 cd	5.5+ 0.2-	4.2+ 0.1 d	0.2+ 0.1-	3.8+ 0.1 c
YOGURT VIABLE *	47.5+ 4.5-	54.0+ 2.0 d	6.6+ 0.1-	4.3+ 0.1 e	0.8+ 0.1-	2.3+ 0.2 a

* Este medio se suplemento con harina de pescado.

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. láctico/100g muestra húmeda.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

Tabla 3.18 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	PROTEINA CRUDA (1)		CENIZAS (1)		CONT. NETO PROTEICO (2)	
	Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)		Tiempo de fermentacion (Dias)	
	8	9	8	9	8	9
CONTROL	35.6+ 1.0	30.3+ 3.0 cd	1.5+ 0.1	1.5+ 0.0 a	17.0+ 0.7	20.2+ 1.7 c
YOGURT VIABLE	25.0+ 1.8	28.5+ 1.0 bc	1.5+ 0.0	1.8+ 0.1 c	16.7+ 1.2	15.7+ 1.0 ab
YOGURT ESTERIL	26.2+ 1.0	25.9+ 0.9 a	1.6+ 0.1	1.9+ 0.2 ab	16.6+ 0.6	13.6+ 0.5 a
SUERO VIABLE	25.0+ 1.8	31.5+ 1.0 cd	1.4+ 0.9	1.8+ 0.1 ab	17.4+ 1.2	17.4+ 0.6 b
SUERO ESTERIL	34.5+ 2.0	31.5+ 1.0 d	1.5+ 0.0	2.2+ 0.2 d	16.1+ 1.3	14.5 0.5 ab
YOGURT VIABLE	35.0+ 1.8	26.3+ 2.0 a	4.6+ 0.2	6.0+ 0.1 e	5.4+ 0.4	4.4+ 0.3 ab

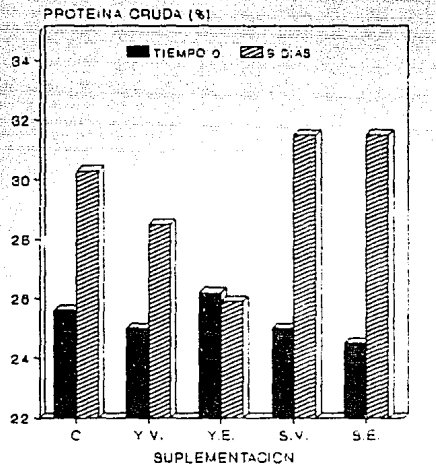
* Este medio se suplemento con harina de pescado.

(1) g/100g muestra seca.

(2) g proteina cruda/g cenizas.

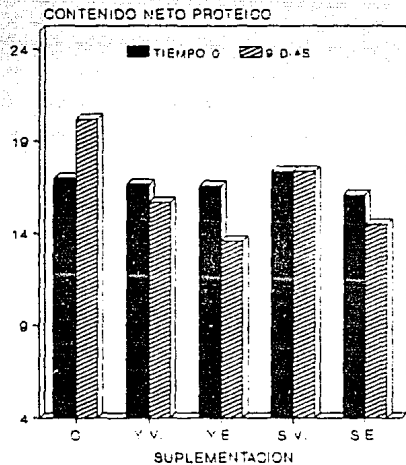
Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.20 EFECTO DE LA ADICION DE CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.



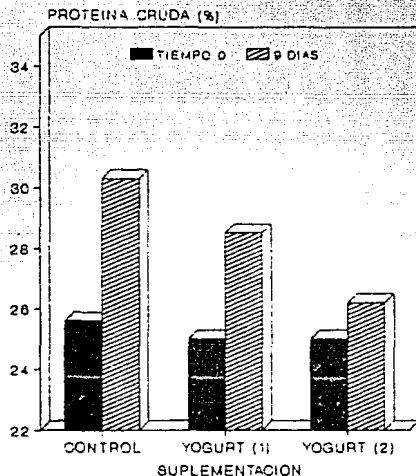
C=CONTROL **S.V.=SUERO VIABLE**
Y.V.=YOGURT VIABLE **S.E.=SUERO ESTERIL**
Y.E.=YOGURT ESTERIL

FIG.3.21 EFECTO DE LA ADICION DE CASEINA Y YOGURT O SUS COMPONENTES SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ.



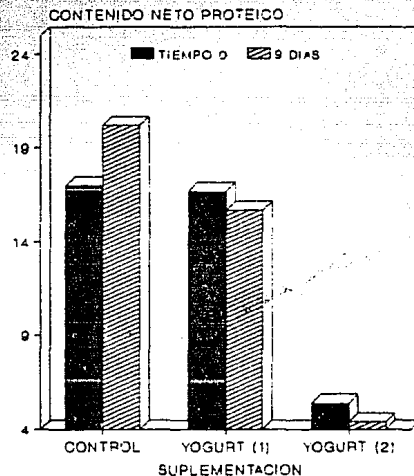
C=CONTROL **S.V.=SUERO VIABLE**
Y.V.=YOGURT VIABLE **S.E.=SUERO ESTERIL**
Y.E.=YOGURT ESTERIL

FIG.3.22 EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ CON YOGURT.



(1) CASEINA (2) HARINA DE PESCADO

FIG.3.23 EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ CON YOGURT.



(1) CASEINA (2) HARINA DE PESCADO

crecimiento de microorganismos lácticos.

El aumento en el contenido de proteína cruda fue mayor en el control (de 25.5 a 30.3%) y en los medios suplementados con caseína y suero, tanto en forma viable, de 25 a 31.5%, como estéril, de 24.5 a 31.5%. (Tabla 3.18, Figuras 3.20 y 3.21).

Sólamente se presentó un aumento significativo en el contenido neto proteico del control, de 17 a 20.2%, dándose incluso una disminución en el resto de los medios, excepto en el suplementado con caseína y suero de yogurt viable, que permaneció sin cambio en 17.4%. (Tabla 3.18 y Figuras 3.22 y 3.23).

A diferencia de lo reportado por Alvarez y López (1987), en estos experimentos la adición de yogurt no presentó un efecto positivo sobre el aumento en el contenido de proteína. Para evaluar si esto resultó de haber utilizado yogurt elaborado en el laboratorio, se estudió dicho efecto utilizando ahora yogurt comercial. Al mismo tiempo, se suplementó nuevamente con ácido láctico para observar la reproducibilidad de los resultados obtenidos anteriormente. Para ello se prepararon dos medios de masa de maíz nixtamalizado suplementados con caseína, añadiendo a uno un 10% de yogurt comercial y un 0.1% de ácido láctico al otro.

El diseño experimental se presenta en la Tabla 3.19 y los

resultados en la Tabla 3.20, realizándose el análisis estadístico Oneway para una probabilidad del 95%

El valor del pH aumentó con la fermentación en la masa suplementada con yogurt (de 5.0 a 6.2), tal vez debido al crecimiento de microorganismos proteolíticos. Como sólo se midió el valor del pH al inicio y a los 9 días de fermentación, no se sabe si éste disminuyó en un principio o si aumentó continuamente desde el inicio de la fermentación. El pH disminuyó en los otros dos medios (de 5.3 a 4.2 en el control y de 5.0 a 4.1 en el suplementado con ácido láctico). (Tabla 3.20). En el medio con yogurt se observó un mayor aumento en el contenido de acidez titulable (de 0.4 a 3.8%), que en el control (de 0.4 a 3.6%) y en el medio con ácido láctico (de 0.4 a 3.5%). (Tabla 3.20), debido a los microorganismos presentes en el yogurt.

El contenido de proteína cruda aumentó más en el medio suplementado con yogurt (de 25.0 a 42.5), que al utilizar ácido láctico (de 25.0 a 32%) y que en el control (de 23.3 a 27.7%). (Tabla 3.20 y Figura 3.24).

Por último, el contenido neto proteico aumentó más en el medio con yogurt (de 13.8 a 17.0%) y con ácido láctico (de 14.8 a 17.0%) y menos en el control (de 13.9 a 14.7%). (Tabla 3.20 y Figura 3.25). Estos resultados corroboran el efecto positivo de la adición de yogurt observado por Alvarez y López (1987).

Tabla 3.19 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O AC. LACTICO.

MEDIO	SUPLEMENTACION	
	YOGURT COMERCIAL (%)	AC. LACTICO (%)
1	---	---
2	10	---
3	---	0.1

Tabla 3.20 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MASA SUPLEMENTADA CON CASEINA Y YOGURT O AC. LACTICO.

PARAMETROS	MEDIOS					
	MASA DE MAIZ Y CASEINA		MASA DE MAIZ, CASEINA Y YOGURT		MASA DE MAIZ, CASEINA Y AC. LACTICO	
TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)	0	9	0	9	0	9
HUMEDAD (1)	51.3 ¹ 1.2	61.7 ² 1.4 a	50.0 ¹ 0.5	50.3 ¹ 0.6 b	53.3 ¹ 1.5	61.7 ² 1.8 a
pH	5.3 ¹ 0.1	4.2 ² 0.1 a	5.0 ¹ 0.0	6.2 ² 0.1 b	5.0 ¹ 0.1	4.1 ² 0.2 a
AC. LACTICO (2)	0.4 ¹ 0.1	3.6 ² 0.0 b	0.4 ¹ 0.0	3.8 ² 0.0 c	0.4 ¹ 0.0	3.5 ² 0.1 a
PROTEINA CRUDA (3)	23.3 ¹ 0.0	27.7 ² 1.5 a	25.0 ¹ 1.0	42.5 ² 0.0 c	25.0 ¹ 0.0	32.0 ² 1.0 b
CENIZAS (3)	1.7 ¹ 0.2	2.2 ² 0.1 a	1.0 ¹ 0.0	2.5 ² 0.1 b	1.7 ¹ 0.1	2.4 ² 0.1 a
CONT. NETO PROTEICO (4)	13.9 ¹ 0.0	14.7 ² 0.0 a	13.0 ¹ 1.0	17.0 ² 0.0 b	14.6 ¹ 0.0	17.0 ² 0.9 b

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. lactico/100g muestra húmeda.

(3) g/100g muestra seca.

(4) g proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas suplementaciones.

FIG.3.24 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT COMERCIAL Y ACIDO LACTICO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON CAFEINA.

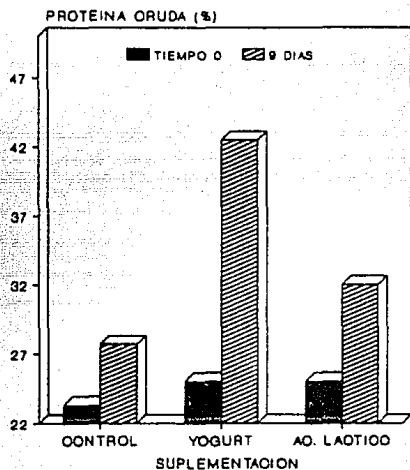
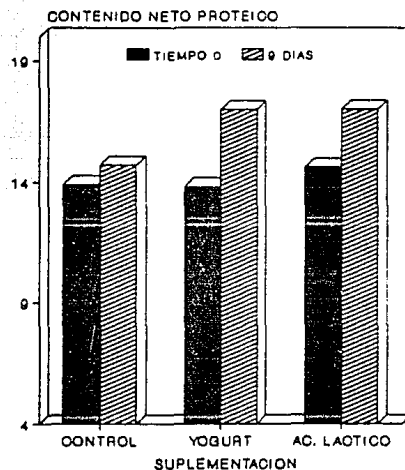


FIG.3.25 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT COMERCIAL Y ACIDO LACTICO SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON CAFEINA.



El hecho de que no se observara este efecto al añadir yogurt elaborado en el laboratorio puede ser debido a que tal vez no se obtuvieron niveles adecuados de ácido láctico o de cuentas de microorganismos lácticos, pues no se determinaron experimentalmente.

3.8 FERMENTACION DE MEZCLAS DE MASA DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL.

Uno de los objetivos principales de este proyecto fue el de aplicar la fermentación del pozol a otros sustratos amiláceos y desechos agrícolas. Se eligió el sorgo debido a que es un cereal fundamental en la alimentación de monogástricos, por lo que sería altamente beneficioso aumentar su contenido proteico mediante una fermentación. Se decidió utilizar también nopal, dado que en su cultivo y comercialización se producen abundantes desechos. Para realizar estos experimentos, se suplementaron medios de sorgo nixtamalizado y de éste mezclado con masa de maíz nixtamalizado, en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1, con harina de pescado hasta obtener contenidos iniciales de proteína de aproximadamente 21.5%. De la misma forma, se suplementaron mezclas de maíz nixtamalizado y nopal en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1. También se les adicionó yogurt en forma viable a medios de maíz nixtamalizado y nopal 1:1 y maíz y sorgo nixtamalizados 1:1.

Se utilizó el diseño experimental de la Tabla 3.21. Los

resultados se presentan en las Tablas 3.22 y 3.23. En este caso, también se utilizó el análisis de varianza Oneway, la prueba de rango múltiple Duncan y contrastes, a una probabilidad del 95%.

En todos los medios se alcanzaron valores de pH similares, entre 4.3 y 4.7. (Tabla 3.22), siendo mayor la disminución en medios con sorgo. El contenido de acidez titulable aumentó en todos los medios, especialmente en los que contenían maíz, debido probablemente a que los microorganismos lácticos presentes en la microflora del pozol se desarrollan mejor en el éste, que es su medio natural (Wacher et al, 1989), (Tabla 3.22). El sorgo contiene cantidades menores de potasio, magnesio, calcio, sodio y hierro que el maíz. Estos cereales también presentan diferencias en sus balances de aminoácidos, careciendo el sorgo de algunos de los que están contenidos en el maíz. Además, este cereal contiene mayor cantidad de vitamina B₁ que el sorgo. Algunas de estas diferencias podrían ser la causa de que las bacterias lácticas se desarrollen mejor en los medios con maíz y favorezcan la fijación de nitrógeno al producir ácido láctico (Buchanan y Gibbons, 1974).

El contenido de proteína cruda presentó un mayor incremento en el control y en las mezclas de maíz con sorgo 1:1, 1:2 y 2:1, y maíz con nopal 1:2 y 2:1, sin observarse diferencias significativas entre ellos. (Tabla 3.23 y Figuras 3.26 y

Tabla 3.21 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO CON SORGO Y NOPAL.

MEDIO	SUPLEMENTACION				
	MAIZ (%)	SORGO (%)	NOPAL (%)	YOGURT (%)	CONT. DE PROTEINA (%)
1	100	---	---	---	20
2	---	100	---	---	19
3	50	50	---	---	19
4	33.3	66.6	---	---	19
5	66.6	33.3	---	---	21
6	45	45	---	10	22
7	50	---	50	---	26
8	33.3	---	66.6	---	24
9	66.6	---	33.3	---	23
10	45	45	---	10	21

Los medios fueron suplementados con harina de pescado.

Tabla 3.22 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS					
	HUMEDAD (1)		pH		AC. TITULABLE (2)	
	Tiempo de fermentación "Días"		Tiempo de fermentación "Días"		Tiempo de fermentación "Días"	
	8	9	8	9	8	9
MAIZ	55.3 ^a	58.5 ^a	6.8 ^d	4.6 ^d	0.7 ^e	4.2 ^e
SORGO	69.8 ^{abc}	65.5 ^{abc}	8.4 ^a	4.7 ^a	0.1 ^a	1.7 ^a
MAIZ*SORGO (1:1)	68.3 ^a	55.5 ^a	7.4 ^b	4.4 ^b	0.2 ^{de}	4.1 ^{de}
MAIZ*SORGO (1:2)	61.8 ^{abc}	68.7 ^{abc}	8.3 ^a	4.5 ^a	0.3 ^d	3.9 ^d
MAIZ*SORGO (2:1)	54.2 ^c	54.2 ^c	8.2 ^a	4.5 ^a	0.3 ^{cd}	3.8 ^{cd}
MAIZ*SORGO (1:1)*	59.3 ^{bc}	58.5 ^{bc}	7.3 ^c	4.7 ^c	0.5 ^a	2.3 ^a
MAIZ*NOPAL (1:1)	67.3 ^{abc}	65.3 ^{abc}	5.8 ^e	4.3 ^e	0.7 ^a	2.3 ^a
MAIZ*NOPAL (1:2)	61.8 ^{bc}	64.2 ^{bc}	6.2 ^f	4.4 ^f	1.0 ^b	3.0 ^b
MAIZ*NOPAL (2:1)	73.2 ^a	60.7 ^a	5.6 ^f	4.4 ^f	0.8 ^b	3.5 ^b
MAIZ*NOPAL (1:1)*	69.2 ^{ab}	65.8 ^{ab}	5.9 ^e	4.4 ^e	1.4 ^{bc}	4.4 ^{bc}

* Estas mezclas contenían un 10% de yogurt viable elaborado en el laboratorio.

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. láctico/100g muestra húmeda.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas mezclas.

Tabla 3.23 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL.

SUPLEMENTACION	PARAMETROS							
	PROTEINA CRUDA (1)		CENIZAS (1)		CONT.NETO PROTEICO (2)		INCREMENTO NETO PROTEICO (3)	
	Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)		Tiempo de fermentación (Días)	
	8	9	8	9	8	9	9	
MAIZ	28.4 ¹ 1.8	26.8 ⁰ 0.8	4.7 ⁰ 0.1	4.0 ⁰ 0.3	4.3 ⁰ 0.2	5.5 ⁰ 0.8	28.5	
SORGO	18.9 ¹ 1.5	19.8 ¹ 1.8	4.9 ⁰ 0.2	5.7 ⁰ 0.3	3.9 ⁰ 0.3	3.5 ⁰ 0.3	-9.1	
MAIZ+SORGO (1:1)	18.9 ¹ 1.5	23.3 ⁰ 0.8	4.7 ⁰ 0.2	5.0 ⁰ 0.8	4.0 ⁰ 0.3	4.7 ⁰ 0.8	16.5	
MAIZ+SORGO (1:2)	18.9 ¹ 1.5	24.2 ⁰ 0.8	4.6 ⁰ 0.2	5.0 ⁰ 0.1	4.1 ⁰ 0.3	4.0 ⁰ 0.8	18.9	
MAIZ+SORGO (2:1)	21.5 ⁰ 0.8	27.7 ¹ 1.5	4.8 ⁰ 0.3	5.0 ⁰ 0.1	4.5 ⁰ 0.8	5.5 ⁰ 0.3	22.8	
MAIZ+SORGO (1:1)*	22.7 ¹ 1.8	24.5 ¹ 1.8	4.0 ⁰ 0.4	5.1 ⁰ 0.1	4.7 ⁰ 0.2	4.0 ⁰ 0.2	1.5	
MAIZ+NOPAL (1:1)	26.5 ² 2.2	27.4 ² 2.2	7.1 ⁰ 0.1	5.6 ⁰ 0.4	3.7 ⁰ 0.3	4.9 ⁰ 0.4	30.5	
MAIZ+NOPAL (1:2)	23.6 ¹ 1.8	29.2 ⁰ 0.5	5.0 ⁰ 0.3	6.0 ⁰ 0.3	4.1 ⁰ 0.3	4.7 ⁰ 0.1	15.3	
MAIZ+NOPAL (2:1)	23.9 ² 2.0	29.4 ⁰ 0.9	7.9 ⁰ 0.4	7.7 ⁰ 0.4	3.0 ⁰ 0.3	3.0 ⁰ 0.1	25.7	
MAIZ+NOPAL (1:1)*	21.0 ² 2.0	22.7 ² 2.0	7.2 ⁰ 0.3	5.7 ⁰ 0.4	2.9 ⁰ 0.3	4.0 ⁰ 0.4	30.3	

* Estas mezclas contenian un 10% de yogurt viable elaborado en el laboratorio.

(1) g/100g muestra seca.

(2) g proteína cruda/g cenizas.

(3) $(2)_1 - (2)_2 / (2)_1 \times 100$.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las mezclas.

FIG.3.26 CAMBIO EN EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ CON SORGO Y MAIZ CON NOPAL SUPLEMENTADAS CON HARINA DE PESCADO

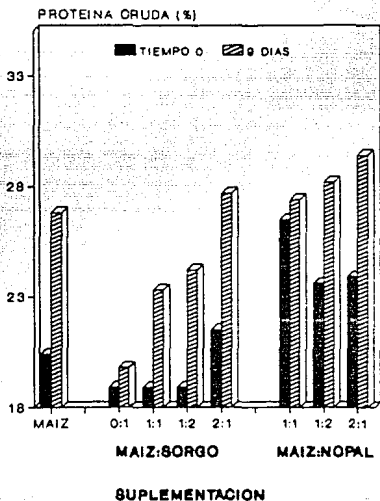


FIG.3.27 CAMBIO EN EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ CON SORGO Y MAIZ CON NOPAL SUPLEMENTADAS CON HARINA DE PESCADO

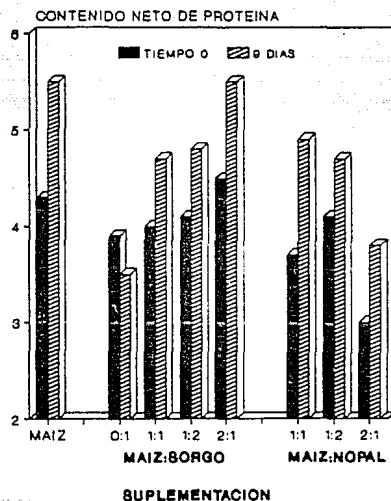


FIG.3.28 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ CON SORGO Y CON NOPAL SUPLEMENTADAS CON HARINA DE PESCADO.

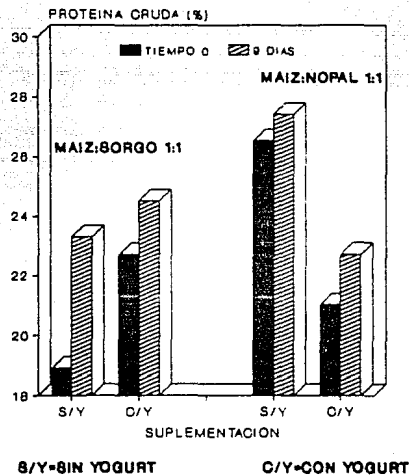
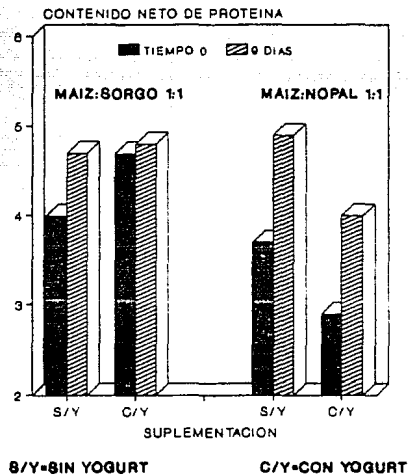


FIG.3.29 EFECTO DE LA ADICION DE YOGURT SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ CON SORGO Y CON NOPAL SUPLEMENTADAS CON HARINA DE PESCADO.



3.28).

Los incrementos netos proteicos en los medios de maíz-nopal 1:1 (32.4%) y 2:1 (30.0%) y en el de maíz-sorgo 1:1 (17.5%), 1:2 (17.1%) y 2:1 (22.2%) no presentaron diferencias significativas con el del control (27.9%). Esto coincide con los resultados obtenidos por Alvarez y López, (1987), en donde se observó que la fermentación no se favorece al utilizar sorgo exclusivamente, aunque en este caso sí se observó que en ciertas proporciones se puede sustituir el maíz por el sorgo y también por el nopal sin afectar la fermentación (Tabla 3.23 y Figuras 3.27 y 3.29).

Dado que el yogurt elaborado en el laboratorio también se empleó para suplementar mezclas 1:1 de maíz y sorgo nixtamalizados y de maíz con nopal tampoco se observó una influencia positiva de la adición de yogurt (Figuras 3.28 y 3.29).

Con el fin de observar la reproducibilidad de estos resultados se decidió repetir la fermentación de los dos medios que presentaron un incremento neto proteico similar al del control, maíz-sorgo nixtamalizados en una proporción de 2:1 y maíz nixtamalizado con nopal, en proporción 1:1.

El diseño experimental se presenta en la Tabla 3.24 y los resultados en la Tabla 3.25 y fueron analizados por medio del

análisis estadístico Oneway a una probabilidad del 95%.

La disminución en el valor del pH fue mayor en el medio de maíz y sorgo nixtamalizados, de 7.3 a 5.1, no presentándose diferencias significativas entre la disminución de los otros dos medios. (Tabla 3.25). El medio con maíz y sorgo también presentó el mayor incremento en el contenido de acidez titulable (de 0.6 a 4.0%), mientras que el medio de maíz con nopal fue el que presentó el menor aumento (de 0.5 a 2.8%). (Tabla 3.25).

No se presentaron diferencias significativas entre los aumentos en el contenido de proteína cruda de los diferentes medios, que aumentó de valores iniciales entre 21.0 y 21.5 a contenidos finales entre 25.9 y 29.1%. (Tabla 3.25 y Figura 3.30).

Tampoco se presentaron diferencias significativas en el aumento en el contenido neto proteico entre los diferentes medios. (Tabla 3.25 y Figura 3.31). Se observó una reproducibilidad en el comportamiento de la fermentación, a pesar de haberse utilizado maíz y harina de pescado de diferente procedencia con respecto al experimento anterior.

Tabla 3.24 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL.

MEDIO	SUPLEMENTACION			
	MAIZ (%)	SORGO (%)	NOPAL (%)	CONT. INICIAL DE PROTEINA (%)
1	100	---	---	21.5
2	66.6	33.3	---	21.8
3	50	---	50	21.5

Los medios fueron suplementados con harina de pescado.

Tabla 3.25 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ Y SORGO NIXTAMALIZADOS Y NOPAL.

PARAMETROS	MEDIOS					
	MAIZ Y CASEINA		MAIZ+SORGO (2:1) Y CASEINA		MAIZ+NOPAL (1:1) Y CASEINA	
TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)	0	9	0	9	0	9
HUMEDAD (1)	58.3 [±] 0.8	49.7 [±] 2.6 a	48.7 [±] 1.4	50.7 [±] 1.2 a	65.7 [±] 0.8	65.3 [±] 1.5 a
pH	6.8 [±] 0.1	5.1 [±] 0.1 b	7.3 [±] 0.8	5.1 [±] 0.1 a	6.8 [±] 0.1	4.4 [±] 0.1 b
AC. TITULABLE (2)	8.7 [±] 0.1	3.6 [±] 0.2 b	8.6 [±] 0.1	4.8 [±] 0.3 a	8.5 [±] 0.8	2.8 [±] 0.1 c
PROTEINA CRUDA (3)	21.5 [±] 1.8	27.4 [±] 1.8 a	21.8 [±] 2.8	25.9 [±] 1.5 a	21.5 [±] 1.8	29.1 [±] 2.8 a
CENIZAS (3)	4.8 [±] 0.1	4.4 [±] 0.8 b	4.8 [±] 0.1	4.2 [±] 0.2 b	6.8 [±] 0.1	5.7 [±] 0.1 a
CONT. NETO PROTEICO (4)	5.4 [±] 0.4	6.2 [±] 0.2 a	5.3 [±] 0.5	6.2 [±] 0.4 a	3.6 [±] 0.3	5.1 [±] 0.4 a

(1) g agua/100g muestra húmeda.

(2) g Ac. láctico/100g muestra húmeda.

(3) g/100g muestra seca.

(4) g proteína cruda/g cenizas.

(5) $(4)_1 - (4)_2 / (4)_1 \times 100$.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las mezclas.

FIG.3.30 EFECTO DE LA ADICION DE SORGO Y NOPAL SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON HARINA DE PESCADO

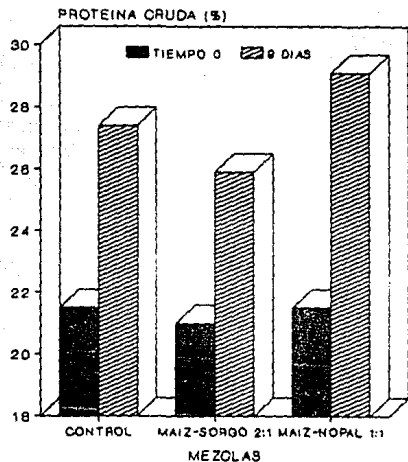
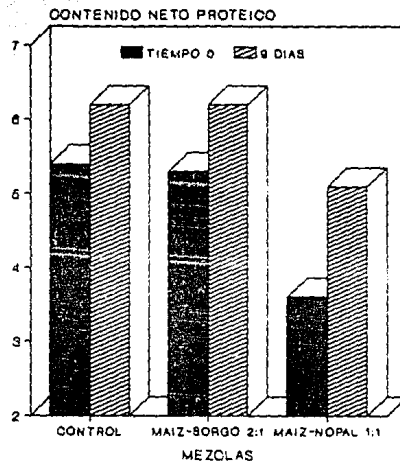


FIG.3.31 EFECTO DE LA ADICION DE SORGO Y NOPAL SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON HARINA DE PESCADO



3.9 FERMENTACION DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y NOPAL.

En base a que se observaron incrementos en el contenido neto proteico al fermentar mezclas de maiz nixtamalizado y nopal, se decidió repetir la fermentación de estos medios, evaluando, además, la fermentación de un medio con mayor proporción de nopal pues, al ser un desecho abundante, sería conveniente utilizarlo en mayores cantidades. Se prepararon mezclas de maiz nixtamalizado y nopal en proporciones 1:1, 1:2 Y 1:3, suplementadas con harina de pescado hasta obtener un contenido inicial de proteína de 22%.

El diseño experimental se presenta en la Tabla 3.26 y los resultados obtenidos en la Tabla 3.27 para la evolución del contenido de humedad, valor del pH, acidez titulable, contenido de proteína y contenido neto proteico. Se aplicó el análisis estadístico Oneway y la prueba de rango múltiple Duncan para una probabilidad del 95%.

En el control la disminución en el valor del pH fue mayor (de 8.1 a 4.4) y menor en el medio de maiz con nopal 1:2 (de 4.9 a 4.4). (Tabla 3.27). Se observó un aumento mayor en el contenido de acidez titulable en el medio con maiz y nopal 1:1 y en el control (de 1.1 a 2.3% y de 0.2 a 1.6%, respectivamente), mientras que no hubo un aumento significativo en el medio de maiz y nopal 1:3 (1.6%). (Tabla 3.27).

Tabla 3.26 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE

MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y NOPAL.

MEDIO	PARAMETROS		
	MAIZ NIXTAMALIZADO (%)	NOPAL (%)	CONT. INICIAL DE PROTEINA (%)
CONTROL	100.0		9
CONTROL CON HARINA DE PESCADO	100.0		22
MAIZ-NOPAL 1:1	50.0	50.0	21
MAIZ-NOPAL 1:2	33.3	66.6	22
MAIZ-NOPAL 1:3	25.0	75.0	23

Los medios con nopal fueron suplementados con harina de pescado.

Tabla 3.27 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y NOPAL.

PARAMETROS	MEDIOS									
	MAIZ		MAIZ Y HARINA DE PESCADO		MAIZ+NOPAL (1:1) Y H. DE PESCADO		MAIZ+NOPAL (1:2) Y H. DE PESCADO		MAIZ+NOPAL (1:3) Y H. DE PESCADO	
TIEMPO DE FERMENTACION DIAS.	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9
HUMEDAD (%)	57.2 ^a 0.8	56.2 ^a 4.7 c	53.7 ^a 1.5	65.7 ^b 3.1 a	74.3 ^b 1.5	68.8 ^b 0.8 d	77.7 ^b 0.6	69.5 ^b 0.5 h	88.8 ^b 0.3	71.7 ^b 2.1 d
pH	8.1 ^a 0.1	4.4 ^a 0.1 a	6.1 ^a 0.1	4.4 ^a 0.2 b	5.4 ^a 0.8	4.2 ^a 0.8 c	4.9 ^a 0.8	4.4 ^a 0.8 e	5.1 ^a 0.8	4.4 ^a 0.8 d
MOLECULEAS TITULABLES (%)	8.2 ^a 0.8	1.6 ^a 0.8 d	1.4 ^a 0.8	1.7 ^a 0.8 b	1.1 ^a 0.1	2.3 ^a 0.2 d	1.4 ^a 0.2	2.2 ^a 0.8 c	1.6 ^a 0.2	1.6 ^a 0.1 a
PROTEINA CRUDA (%)	9.8 ^a 0.8	14.1 ^a 0.8 a	23.5 ^a 1.1	29.4 ^a 0.8 ab	21.9 ^a 0.5	27.1 ^a 2.8 a	22.1 ^a 1.8	32.0 ^a 0.8 c	22.7 ^a 1.8	28.5 ^a 0.8 b
CEZAS (%)	1.7 ^a 0.1	2.3 ^a 0.1 d	6.4 ^a 0.5	7.8 ^a 0.2 e	7.4 ^a 0.5	6.8 ^a 0.5 b	10.8 ^a 0.8	8.6 ^a 0.1 a	10.8 ^a 0.6	9.9 ^a 0.4 c
CONTENIDO PROTEICO (%)	6.1 ^a 0.8	7.1 ^a 0.8 b	3.9 ^a 0.2	4.2 ^a 0.8 c	3.8 ^a 0.1	4.3 ^a 0.3 a	2.2 ^a 0.1	3.7 ^a 0.8 a	2.1 ^a 0.1	2.9 ^a 0.8 h

(1) y agua/100g muestra húmeda.

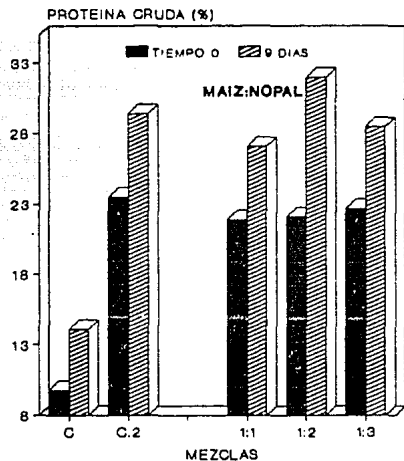
(2) y Ac. láctico/100g muestra húmeda.

(3) y/100g muestra seca.

(4) y proteína cruda/g cenizas.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas mezclas.

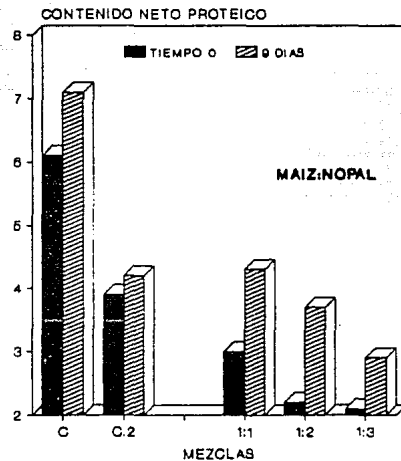
FIG.3.32 EFECTO DE LA ADICION DE NOPAL SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON HARINA DE PESCADO



C-CONTROL

C.2-CONTROL SUPLEMENTADO CON HARINA DE PESCADO

FIG.3.33 EFECTO DE LA ADICION DE NOPAL SOBRE EL CONTENIDO NETO PROTEICO EN LA FERMENTACION DE MASA DE MAIZ SUPLEMENTADA CON HARINA DE PESCADO



C-CONTROL

C.2-CONTROL SUPLEMENTADO CON HARINA DE PESCADO

El aumento en el contenido de proteína cruda fue mayor en el medio de maíz y nopal 1:2 (de 22.1 a 32.0%) (Tabla 3.27 y Figura 3.32).

El contenido neto proteico aumentó menos en el medio de maíz con harina de pescado (de 3.9 a 4.2%) y más en los medios de maíz con nopal en proporciones 1:1 (de 2.9 a 4.0) y 1:2 (de 2.2 a 3.7). (Tabla 3.27 y Figura 3.33), lo que indica que en esta fermentación el nopal favoreció la fijación de nitrógeno.

Se eligió el medio con maíz y nopal 1:1 para determinar su análisis proximal, digestibilidad *in vitro* y valor energético, con el fin de determinar si podía utilizarse como alimento animal. También se realizaron estas determinaciones en el control y en el medio de maíz con harina de pescado para poder compararlos.

Los resultados del análisis proximal, digestibilidad *in vitro* y valor energético se presentan en la Tabla 3.28.

El contenido inicial de grasa fue mayor en los medios con harina de pescado, tanto con nopal como sin él, debido a la grasa del pescado y aumentó más con la fermentación en los medios sin nopal. Esto se debió a una pérdida de materia orgánica, ya que se observó un incremento en el contenido de cenizas. Sin embargo, al dividir el valor obtenido de grasa

entre el contenido de cenizas, se observó que en el medio con nopal no hubo diferencias significativas en el contenido neto de grasa con la fermentación. En los controles el contenido neto de grasa sí aumentó, lo que indica una transformación de los carbohidratos en lípidos, por medio del sistema Malonil-CoA (Rose, 1977). (Tabla 3.28).

El contenido de fibra cruda aumentó en los dos controles, debido parcialmente a una pérdida de materia orgánica y a la formación de la pared celular de los microorganismos desarrollados durante la fermentación, ya que también se presentó un aumento en el contenido neto de fibra cruda (Rose, 1977). (Tabla 3.28).

El contenido de carbohidratos disminuyó durante la fermentación en los tres medios, especialmente en los controles, debido a una pérdida mayor de materia orgánica, como lo indica el aumento en el contenido de cenizas. Esta disminución de los carbohidratos fue debida a su utilización como fuente de energía en la producción de biomasa y a su transformación en grasa, como se indicó anteriormente. (Tabla 3.28).

En los medios con harina de pescado la digestibilidad *in vitro* fue mayor, pues ésta es una buena fuente proteica de alto valor biológico. Dicha digestibilidad aumentó con la fermentación en los medios de maíz solo y de maíz con nopal,

Tabla 3.28 EVOLUCION DE LA FERMENTACION DE MEZCLAS DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y NOPAL.

PARAMETROS	MEDIOS					
	MAIZ		MAIZ Y HARINA DE PESCADO		MAIZ+NOPAL (1:1) Y H. DE PESCADO	
TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)	8	9	8	9	8	9
PROTEINA CRUDA (1)	9.8±0.8	14.1±0.8 a	23.5±1.1	29.4±0.8 ab	21.9±0.5	27.1±2.8 a
CENIZAS (1)	1.7±0.1	2.3±0.1 b	6.4±0.5	7.8±0.2 c	7.4±0.5	6.8±0.5 a
CELSULOSA (1)	3.5±0.3	6.1±0.8 c	4.1±0.2	6.4±0.1 b	4.2±0.2	4.9±0.1 a
FIBRA CRUDA (1)	1.4±0.1	2.4±0.2 b	1.3±0.8	2.6±0.1 c	2.3±0.1	2.3±0.1 a
PERCENTAJE DE AZUCAR (1)	83.6±0.4	75.1±0.3 b	64.7±1.8	53.8±0.4 b	64.2±1.3	58.9±2.7 a
DIGESTIBILIDAD (2)	78.2±2.4	88.1±3.3 a	92.9±0.7	91.1±0.8 c	89.8±0.8	98.5±0.7 b
VALOR ENERGÉTICO (3)	6237±28	4888±28 b	5881±8	3456±68 c	4588±3	4912±13 a

(1) g/100g muestra seca.

(2) % proteína cruda digerible: $100 - ((g \text{ proteína indigerible} / g \text{ proteína total}) \times 100)$

(3) calorías/g muestra seca.

Letras distintas representan diferencias significativas entre las diversas mezclas.

mientras que en el medio con harina de pescado se mantuvo sin cambios (Tabla 3.28). La fermentación láctica aumenta la digestibilidad del sustrato y el contenido de aminoácidos, como lisina y triptófano (Hamad y Fields, 1979; Lay y Fields, 1981), debido a transaminación (Tongnual *et al.*, 1981) y/o a la destrucción de compuestos capaces de formar complejos con las proteínas, por lo que éstas son liberadas y pueden ser hidrolizadas por las enzimas intestinales (Finot, 1973).

Sólo en el medio de maíz con nopal se presentó un aumento en el valor energético, de 4,588 a 4,912 cal/g, es decir, un aumento de 325 cal/g. Durante la fermentación el contenido de proteína aumentó de un valor inicial de 21.9% en base seca con un contenido de cenizas de 7.4%, hasta un valor final de 27.1% de proteína con 6.8% de cenizas. Estos valores corresponden a 21.9/6.8 g de proteína por cada gramo de cenizas. Si se sustrae el valor inicial del final, se obtiene que la ganancia de proteína por cada gramo de cenizas es de 1 g. Para obtener la ganancia de proteína por cada gramo de sustrato se requiere multiplicar el valor anterior por el contenido final de cenizas en 1g de sustrato, es decir: 1g de proteína/g de cenizas x 0.074 g de cenizas/g de sustrato = 0.074g proteína/g de sustrato. Dado que el aporte energético de las proteínas es de 4 Kcal/g, el incremento en el contenido energético del sustrato debido a la ganancia de proteína es de: 0.074g de proteína/g de sustrato x 4 Kcal/g de proteína = 296 cal/g de sustrato. Este valor es similar al incremento en el valor

energético determinado experimentalmente. Lo anterior apoya la hipótesis de la fijación de nitrógeno en la fermentación del pozol, ya que dicho aumento se debe a las calorías aportadas por la proteína fijada (Tabla 3.28).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

V. CONCLUSIONES.

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

-En la mayoría de los medios de fermentación durante la elaboración de este proyecto, se presentó un aumento en el contenido de acidez titulable y una disminución en el pH, lo que indica que la fermentación fue de tipo láctico.

-El tiempo óptimo de la fermentación, tanto inoculada con microflora mixta de pozol como espontánea, entre los tiempos evaluados, fue a los 9 días, obteniéndose a este tiempo contenidos netos proteicos similares en ambas fermentaciones.

-El compuesto nitrogenado obtenido en mayores proporciones durante la fermentación es la proteína soluble. La urea y el amoníaco se obtuvieron en concentraciones muy pequeñas.

-La fijación de nitrógeno se vió favorecida por: La adición de yogurt comercial y de ácido láctico, de caseína a un nivel inicial de proteína de 25 y 33.7%, de harina de pescado a niveles de 21.5 y 24.5% y con gluten de maíz a un nivel inicial de 17%. Aunque la presencia del hidróxido de calcio favorece la fijación de nitrógeno, el proceso global de la nixtamalización presenta una influencia mucho más marcada.

-Al utilizar sorgo como medio de fermentación no se presenta fijación de nitrógeno. Las mezclas que presentaron una mayor fijación de nitrógeno fueron las de maíz nixtamalizado con nopal en proporciones 1:1 y 1:2. Al fermentar mezclas de sorgo y maíz nixtamalizados y maíz con nopal, se presenta un incremento en el contenido neto proteico, por lo que se podría sustituir parte del maíz por estos sustratos para la producción de alimentos para animales, una vez evaluado su valor biológico.

-El valor energético aumentó en el medio de maíz-nopal 1:1 y dicho incremento corresponde aparentemente a las calorías aportadas por la proteína fijada.

RECOMENDACIONES.

La fermentación del pozol no ha sido suficientemente estudiada y en este proyecto sólo han sido evaluados algunos parámetros de ésta. En vista de los resultados obtenidos, se han presentado nuevos aspectos que requieren ser estudiados. Dentro de los de mayor importancia se pueden señalar los siguientes:

-Definir la bioquímica de la fermentación del pozol, por medio de la determinación de los metabolitos producidos (AGVs, etanol, etc.), para las diferentes variables consideradas, como son el tipo y nivel de la fuente de nitrógeno, la

utilización de mezclas de maíz con otros sustratos, etc.

-Estudiar la microflora natural en relación con la bioquímica, cuantificando los microorganismos en cada paso de la fermentación y clasificarlos.

-Determinar el valor nutricional de los productos obtenidos (CPER) y realizar un estudio económico de éstos, con el fin de evaluar si sería conveniente utilizarlos en la producción de alimentos para monogástricos.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Aguilera, D. 1989. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LA FERMENTACION DEL POZOL. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México, D.F. 84-86p.
2. Alais, C. 1981. CIENCIA DE LA LECHE. 1a. Ed. Cía. Editorial Continental, S.A. México. D.F. 31-37p.
3. Alvarez, E. y López, A. 1987. FERMENTACION LÁCTICA DE MATERIALES FECULENTOS PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS PARA MONOGÁSTRICOS. Tesis profesional. Universidad La Salle. México, D.F. 134-136p.
4. Babich, H. y Stotzky, G. 1985. HEAVY METAL TOXICITY TO MICROBE-MEDIATED ECOLOGIC PROCESSES: A REVIEW AND POTENTIAL APPLICATION TO REGULATORY POLICIES. Environ. Res. 36: 111-137.
5. Berger, J. 1962. MAIZE PRODUCTION AND THE MANURING OF MAIZE. Centre de Etude de l'azote. Ginebra, Suiza. 161, 180, 183, 185, 195, 298-300p.
6. Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. 1974. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8a. Ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 490-492, 511-513, 577-593pp.
7. Burris, R. 1975. PREPARATION AND PROPERTIES OF NITROGENASE PROTEINS. En Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms. 1a. ed. Steward, W.D.P. Cambridge University Press. Cambridge. 333-349p.
8. Cannon, M., Hill, S., Kavanagh, E. y Cannon, F. 1985. A MOLECULAR GENETIC STUDY OF *nif* EXPRESSION IN *Klebsiella pneumoniae* AT THE LEVEL OF TRANSCRIPTION, TRANSLATION AND NITROGENASE ACTIVITY. Mol. Gen. Genet. 198: 198-206.

9. Corinne, H. 1979. FUNDAMENTOS DE NUTRICION NORMAL. 2a. ed. Cía. Editorial Continental, S.A. México, D.F. 99-110p.
10. Cravioto, R., Cravioto, O., Massieu, H. y Guzmán, G. 1955. EL POZOL, FORMA INDIGENA DE CONSUMIR MAIZ EN EL SURESTE DE MEXICO Y SU APORTE DE NUTRIENTES A LA DIETA. Ciencia, Méx. 15:27-30
11. Cruz, S. y Ulloa, M. 1973. ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAIZ CONSUMIDOS EN MEXICO Y OTROS PAISES LATINOAMERICANOS. Rev. Soc. Méx. Hist. Nat. 24:423-453
12. Emerson, D. y Wall, J. 1987. NITROGEN FIXATION. En Comprehensive Biotechnology. 1a. ed. Pergamo Press. USA. 73-107p.
13. Fearon, W. 1939. THE CARBAMIDE DIACETYL REACTION: A TEST FOR CETRULLINE. Biochem. J. 33:902
14. Finol, P.A. 1973. CHEMICAL MODIFICATION OF THE FOOD PROTEINS. INCIDENCE IN THEIR NUTRITIVE VALUE. Protein Seminar 1972-1973. 47-53pp.
15. Gómez, H. 1983. ORIENTACION DE LAS FERMENTACIONES LACTICA Y ALCOHOLICA EN CULTIVOS MIXTOS POR CAMBIOS AMBIENTALES. Tesis de Maestría. Fac. de Química. Univ. Auton. Méx. México, D.F. 43p.
16. Hamad, A. y Fields, M. 1979. EVALUATION OF THE PROTEIN QUALITY AND THE AVAILABLE LYSINE OF GERMINATED AND FERMENTED CEREALS. J. Food Sci. 44:456
17. Harsall, D. y Gibson, A. 1985. CELLULOSE DECOMPOSITION AND ASSOCIATED NITROGEN FIXATION BY MIXED CULTURES OF *Cellulomonas gelida* AND *Azospirillum species* OR *Bacillus macerans*. Appl. Environ. Microbiol. 50:1021-1026

18. Horwitz, W. 1980. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE A.O.A.C. 13a. ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington. 16, 211, 213, 132, 366, 858p.
19. Jensen, V. y Holm, E. 1975. ASSOCIATIVE GROWTH OF NITROGEN-FIXING BACTERIA WITH OTHER MICROORGANISMS. En Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. 1a. ed. Steward, W.D.P. Cambridge University Press. Cambridge. 101-117p.
20. Kent, M.A. 1971. TECNOLOGIA DE LOS CEREALES. 1a. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 37p.
21. Kundu, B. y Gaur, A. 1984. RICE RESPONSE TO INOCULATION WITH N-SUBC2)-FIXING AND P-SOLUBILIZING MICROORGANISMS. Plant and Soil. 79: 227-243
22. Lay, M. y Fields, M. 1981. NUTRITIVE VALUE OF GERMINATED CORN AND CORN FERMENTED AFTER GERMINATION. J. Food Sci. 46:1069
23. Leal, H., Wachter, C., Alvarez, E., López, A. y Saint-Phard, C. 1987. ESTUDIO DE CAMBIOS EN EL CONTENIDO PROTEICO DE SUBPRODUCTOS AGRICOLAS POR FERMENTACION CON MICROFLORAS MIXTAS. Simposio Latinoamericano de Biotecnología para la Producción de Biomasa y Tratamiento de Desperdicios. Antigua, Guatemala. 289-304p.
24. Lehninger, A. 1978. BIOQUIMICA. 2a. ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 53-55p.
25. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R. 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. Biol. Chem. 193: 265-275
26. Lynch, J., Harper, S., Chapman, S. y Veal, D. 1984. CONTROLLED COMPOSTING OF STRAW. Appl. Biochem.

Biotechnol. 9: 379-380

27. Milner, M., Scrimshaw, N.S. y Wang, D. 1978. PROTEIN RESOURCES & TECHNOLOGY. STATUS AND RESEARCH NEEDS. 1a. Ed. AVI Publishing Company, Inc. Connecticut.

28. Moo-Young, M., Hasnain, S. y Lamptey, J. 1986. THE DEVELOPMENT OF *Azotobacter* AS A BACTERIAL FERTILIZER BY THE INTRODUCTION OF EXOGENOUS CELLULASE GENES. *Biotechnology and Renewable Energy*. 125-134p.

29. Mulder, E. 1975. PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF FREE-LIVING, NITROGEN-FIXING BACTERIA. En *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms*. 1a. ed. Steward, W.D.P. Cambridge University Press. Cambridge. 3-25p.

30. Muñoz, G. y Viniegra, G. 1981. FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO POR UN CULTIVO MIXTO DE UNA BACTERIA LACTICA Y *Azotobacter chroococcum*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 23: 213:217

31. Parr Operating Instructions. 1984

32. Prescott, S. y Dunn, C. 1982. INDUSTRIAL MICROBIOLOGY. 4a. ed. AVI Publishing Company, Inc. Connecticut. 493-521p.

33. Rangeley, A. y Knowles, R. 1988. NITROGEN TRANSFORMATIONS IN A SCOTTISH PEAT SOIL UNDER LABORATORY CONDITIONS. *Soil Biol. Biochem.* 20: 385-391

34. Rose, A. 1977. MICROBIOLOGIA QUIMICA. 2a. ed. Alhambra. Madrid. 312-315p.

35. Schultz, H., Day, E. y Sinnhuber, R. 1962. SYMPOSIUM ON FOODS: LIPIDS AND THEIR OXIDATION. The AVI Publishing Company, Inc. Connecticut. 173-186p.

36. Sergio Sánchez. 1988. NITROGEN SOURCES CONTROL OF THE MICROBIAL PROCESS. Ed. CRC Press. Florida. 2-16pp.

37. Silvester, W. 1989. MOLYBDENUM LIMITATION OF ASYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN FORESTS OF PACIFIC NORTHWEST AMERICA. *Soil. Biol. Biochem.* 21: 283-289
38. Steinkraus, K. 1983. HANDBOOK OF INDIGENOUS FERMENTED FOODS. Vol. 9 of Microbiology Series. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 189-238p.
39. Stougaard, J. y Kennedy, C. 1988. REGULATION OF NITROGENASE SYNTHESIS IN HISTIDINE AUXOTROPHS OF *Klebsiella pneumoniae* WITH ALTERED LEVELS OF ADENYLATE NUCLEOTIDES. *J. Bacteriol.* 170: 250-257
40. Taboada, J., Salinas, C., Ulloa, M. y Herrera, T. 1975. FIJACION DE NITROGENO EN CULTIVOS MONOESPECIFICOS Y MIXTOS DE *Aerobacter aerogenes* Y *Agrobacterium azotophilum*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 17: 157-159
41. Taboada, J. y Herrera, T. 1971. ESTUDIO SOBRE INHIBIDORES DE LA FIJACION DE NITROGENO EN *Agrobacterium azotophilum*. *An. Inst. Biol. Exp. Univ. Nal. Autón. México*, 42 SER Biol. Exp. 1:23-30
42. Taboada, J. y Herrera, T. 1972. EFECTO DE AMINOACIDOS SOBRE LA FIJACION DE NITROGENO POR *Agrobacterium azotophilum*. *An. Inst. Biol. Univ. Autón., México*. 43, SER Biol. Exp. 1:35-42
43. Tongnual, P., Nanson, N. y Fields, M. 1981. EFFECT OF PROTEOLYTIC BACTERIA IN THE NATURAL FERMENTATION OF CORN TO INCREASE ITS NUTRITIVE VALUE. *J. Food Sci.* 46:100-104
44. Tovar, L. 1981. EFFECTS OF TREATMENT WITH ALKALI ON THE NUTRITIONAL CHARACTERISTICS OF PROTEIN. Tesis Doctoral. Uni. California, Berkeley.

45. 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. Nal. Autón. México 47-53, SER Botánica, 145-163
46. Vose, P. y Blixt, S. 1984. POTENTIAL FOR ENHANCING BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. Crop. Breeding. A Contemporary Basis. 185-215p.
47. Wachter, C., Leal, H., Alvarez, E., López, A. y Aguilera, D. 1989. STUDY ON THE PARAMETERS THAT AFFECT PROTEIN PRODUCTION DURING THE FERMENTATION OF POZOL. Fifth International Symposium on Microbial Ecology. Kyoto. 97p.
48. Windsor, M. y Barlow, S. 1984. INTRODUCCION A LOS SUBPRODUCTOS DE PESQUERIA. 1a. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 63 y 73pp.
49. Wolf, W. y Cowan, J. 1979. SOYBEANS AS A FOOD SOURCE. 1a. ed. CRC Press. Florida. 51-54p.