

**DESARROLLO DE UNA BEBIDA FERMENTADA
CON ADICIÓN DE COCCIÓN DE MAÍZ**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**DIRIGIDO POR:
MARTHA STELLA HOLGUÍN HERNÁNDEZ
MSC. MICROBIOLOGÍA**

ANGÉLICA GINNETH FULA ARGUELLO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BOGOTÁ, 2010**

INTRODUCCIÓN

En vista del impacto ambiental que se produce por la generación de residuos, se hace necesario convertir los desechos en productos que puedan satisfacer las necesidades de la humanidad.

La generación de residuos no sólo implica la contaminación del ambiente, sino que además aumenta los costos de producción debido al tratamiento que se debe dar a los residuos, por lo tanto, disminuye la competitividad de cualquier tipo de empresa en el mercado.

Así, se genera la necesidad de emplear el conocimiento científico para desarrollar un nuevo producto derivado de los residuos líquidos de la cocción del maíz, que además de evitar los sobrecostos de tratamiento, disminuir el impacto ambiental y los demás factores que afecta la generación de los mismos, se pueda comercializar un producto que cumpla con todos los parámetros de calidad exigidos por las autoridades sanitarias competentes.

El presente trabajo es además una invitación para analizar el entorno y tratar de optimizar todos los recursos que se desechan de una u otra forma y convertirlos en un programa productivo que generará retribuciones económicas, pero lo más importante, evitará la creciente contaminación de nuestro planeta.

La autora

RESUMEN

Se evaluó la posibilidad de desarrollar una bebida fermentada conocida en Colombia como masato, en la cual se determinaron las condiciones de pH, temperatura, tiempo de fermentación, cantidad de azúcar necesario para llevar el proceso a cabo. Se evaluó también el efecto de la pasteurización, refrigeración, la adición de extracto de clavo, canela y sorbato de potasio, para determinar las condiciones requeridas para la conservación del producto y finalmente se determinó la vida útil. En cada uno de los ensayos se tomó como parámetros fisicoquímicos la medición del pH, la acidez, sólidos solubles, sólidos totales, grados de alcohol y como parámetros microbiológicos el recuento de hongos y levaduras, mesófilos, coliformes totales y bacterias ácido-lácticas. Se obtuvo como resultado que el producto cumple con los parámetros normativos en cuanto a calidad microbiológica, con una vida útil de 15 días.

Palabras clave: fermentación, maíz, masato.

ABSTRACT

The possibility for development a drink fermented knew in Colombia as masato was evaluated, where the conditions of pH, temperature, fermentation's time and sugar amount was determinated for the product. Also, the pasteurization, refrigeration, add of cloves and cinnamon extract and potassium sorbate effect was evaluated to determinate the conditions requerides for the product conservation and finally the life shelf was determinated. Each one of the formulations was measured physicochemical parameters: pH, acidity, total sugar, dry matter, alcohol percent, and microbiological parameters: recount of yeast, mesofiles, total coliforms and acid lactic bacteria. The result was a product with safety and quality microbiological and 15 days of life.

Key words: fermentation, corn, masato

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	2
Resumen	3
Abstract	3
Justificación	6
1 Objetivos.....	7
1.1 Objetivo General.....	7
1.2 Objetivos Específicos	7
2 Marco Teórico.....	8
2.1 Fermentación.....	8
2.1.1 Fermentación láctica u homoláctica.....	8
2.1.2 Fermentación alcohólica.....	8
2.2 Microorganismos	9
2.3 Aditivos (saborizantes y conservantes).....	11
2.4 Antecedentes del masato	11
3 Planteamiento del Problema.....	15
4 Metodología.....	16
4.1 Materiales y Equipo	16
4.1.1 Materiales.....	16
4.1.2 Equipos	16
4.2 Especificación metodológica.....	17
4.2.1 Diseño experimental.....	17
4.2.2 Procedimiento.....	19
4.3 Metodología de análisis	21
4.3.2 Determinación de grados Brix.....	21
4.3.3 Determinación de sólidos totales.	21
4.3.4 Determinación de grados de alcohol.....	21
4.3.5 Análisis microbiológico.	21
5 Resultados y discusión	22
5.1 Determinación de las condiciones de fermentación del masato	22
5.2 Preparación de las muestras	23
5.3 Preparación de la formulación final.....	28

6	Conclusiones	30
7	Recomendaciones	31
8	Agradecimientos	31
9	Bibliografía.....	32

JUSTIFICACIÓN

En vista del alto nivel de contaminación que generan los residuos líquidos derivados de la cocción del maíz por la alta demanda de oxígeno, y a la posibilidad de utilizarlos para generar una bebida comercial, se decide realizar el estudio para la transformación de estos residuos en un nuevo producto conocido como masato.

Actualmente, el residuo líquido procedente de la cocción de maíz es aproximadamente 5 m³ provenientes de la cocción 2660 kg de maíz en una empresa del sector, de los cuales se desechan realmente 720 litros diarios. A estos vertimientos se les realiza un tratamiento primario de rejillas, mallas o tamices, tanto en la zona de producción como en el sistema interno de alcantarillado (trampas de grasa).

Dichos residuos aumentan la demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO); además los sólidos sedimentables suspendidos, sólidos totales se encuentran sobre los límites permitidos de acuerdo con la decreto 1594 del 1984 y la resolución DAMA 1074 de 1997. Así mismo, el desecho de residuos con alto contenido de sólidos es un factor que genera el taponamiento en las tuberías, sin contar el impacto ambiental que puede producir en la fuente receptora (fuentes de agua)

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Aprovechar el residuo derivado de la cocción de maíz para desarrollar una bebida fermentada como el masato utilizando microorganismos, con caracterización fisicoquímica para envasar y comercializar.

1.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar las diferentes composiciones para el masato en función del valor de pH, porcentaje de acidez, grados de etanol, grados Brix.
2. Determinar las condiciones temperatura, tiempo y cantidad de azúcar empleado para la fermentación del residuo de la cocción del maíz.
3. Determinar si es necesaria la adición de conservantes y estabilizantes para la inhibición de los microorganismos que participan en la fermentación del masato.
4. Determinar el tiempo de vida útil del masato luego de ser envasado.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Fermentación

La fermentación es el proceso de transformación química de las sustancias orgánicas, llevado a cabo por las enzimas producidas por los microorganismos y que, generalmente, va acompañado de un desprendimiento de gases y de un efecto calorífico.

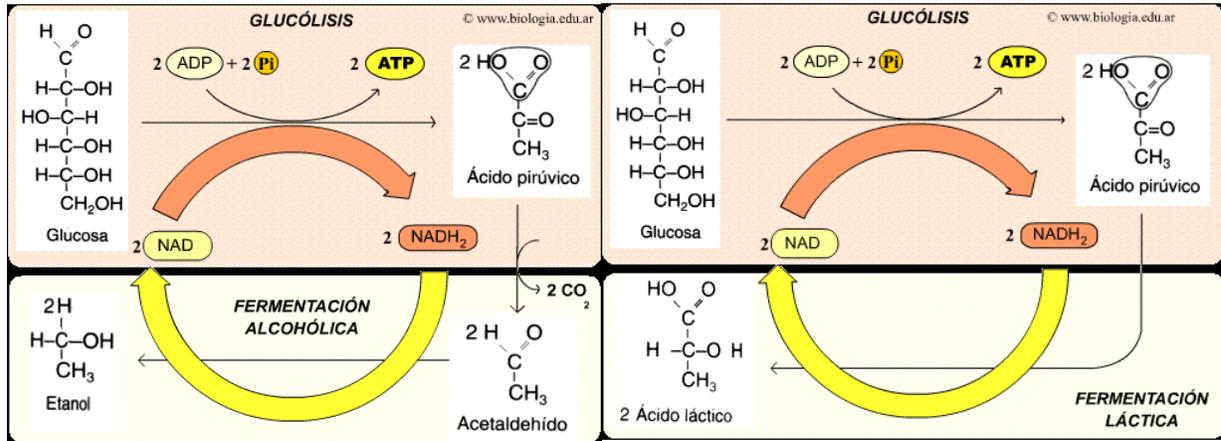
2.1.1 Fermentación láctica u homoláctica

Se denomina así a la conversión de glucosa en lactato como único producto importante, siguiendo la ruta glucolítica encontrada en los músculos, cuya diferencia es el isómero producido: en la ruta glucolítica se produce el isómero (L) y en la fermentación láctica se produce el isómero (D) o una mezcla de los dos isómeros, dependiendo del microorganismo que lleve a cabo dicha fermentación. Esta fermentación se lleva a cabo en un solo paso y es la responsable de la producción de derivados lácteos como yogurt, quesos, cuajada, kéfir. El ácido láctico producido tiene propiedades conservantes en los alimentos.

2.1.2 Fermentación alcohólica

Es la conversión de la glucosa en etanol, especialmente por las levaduras, quienes descarboxilan primero el piruvato para formar acetaldehído. Se lleva a cabo en dos etapas: la primera que convierte el piruvato en acetaldehído y CO_2 , el acetaldehído con NADH_2 produce ácido láctico. Este tipo de fermentación tiene aplicaciones en la industria de alimentos en la producción de pan, cerveza, vino y otras.

Figura 1. Esquema de la fermentación Láctica y alcohólica



Fuente: Tomado de <http://fai.unne.edu.ar/biologia/metabolismo/figeta/lactica.gif>
<http://fai.unne.edu.ar/biologia/metabolismo/figeta/etilica.gif>. Consultado el 16 de abril de 2009

2.2 Microorganismos

Los microorganismos son los responsables de la fermentación de cualquier tipo de producto, éstos pueden ser bacterias, mohos, levaduras o una combinación de ellos.

De acuerdo con la demanda de oxígeno para el crecimiento del microorganismo, es posible clasificarlos así:

Aerobios: únicamente pueden metabolizar y crecer en presencia de oxígeno atmosférico.

Anaerobios: que no sólo metabolizan y crecen en ausencia de oxígeno libre, sino que necesitan que sea eliminado ya que les es perjudicial.

Facultativos: capaces de cambiar su metabolismo, de aerobio a anaerobio, en función del ambiente donde se hallen. (Vicent, y otros, 2006)

Industrialmente los microorganismos se conocen como cultivos y tienen las siguientes funciones:

- 1- Producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa: Este ácido le imparte un sabor ácido y refrescante. En el masato, produce el sabor ácido característico.
- 2- Para la producción de compuestos volátiles los cuales contribuyen al sabor de los productos. En el caso específico del maíz se produce diacetilo, ácido butírico y ácido láctico por lacto bacterias a partir del almidón (Escamilla, 2000)
- 3- La acidificación de los productos previene el crecimiento de los patógenos y de microorganismos que deterioran el producto, así como la producción de bacteriocinas que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram (+) y Gram (-). (Mollendorff, y otros, 2006)
- 4- La formación de otros productos como alcohol, aunque en este caso en pequeñas proporciones.

Es necesario tener en cuenta que existen ciertos factores que impiden el crecimiento de los microorganismos, dentro de los cuales es posible mencionar: calidad del sustrato, contaminantes químicos residuales de la higienización, temperatura inadecuada, contaminación con otro tipo de microorganismos específicos.

Se han realizado estudios en donde se concluye que la fermentación de alimentos con base en cereales involucra una mezcla de diferentes tipos de microorganismos: bacterias, levaduras y/o hongos (Arci, y otros, 2002), (Aidoo, y otros, 2006).

Levaduras: Se ha podido establecer que en los productos fermentados elaborados a partir de cereales se han encontrado diferentes tipos de levaduras, dentro de los cuales se pueden resaltar *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces sake*, *Hansenula anómala*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Hansenula subpelliculosa*, *Candida sake*, *Torulaspota inconspicua*, *Pichiapolymorpha*. Este tipo de flora favorece la degradación del almidón, produce fermentación alcohólica, además de favorecer la textura del producto y brindarle las características organolépticas típicas del producto. (Aidoo, y otros, 2006) (Schwan, y otros, 2007) (Shrestha, y otros, 2002)). El pH en el cual existe crecimiento de las levaduras se encuentra entre 2,5 y 8,5, son

microorganismos mesófilos, es decir que su temperatura de crecimiento se encuentra entre 18 y 22°C actividad de agua (A_W) de 0,90.

Bacterias ácido-lácticas: En productos fermentados a partir de cereales se encuentra que existen: *Leuconostoc*, *Lactobacillus spp.* (Arci, y otros, 2002) La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 y 40°C, aunque presentan crecimiento entre 18 y 22°C, pero su metabolismo es más lento, pH de crecimiento entre 3,8 y 7,2. Actividad de agua (A_W) de 0,90.

2.3 Aditivos (saborizantes y conservantes)

Teniendo en cuenta que el principal inconveniente es la conservación del alimento y el pH del mismo, se encontraron los aditivos posibles a emplear enumerados en la tabla 1. (Arias, 2006; MERCK, 2006)

2.4 Antecedentes del masato

El masato es una bebida tradicional colombiana, preparada con maíz, arroz o una mezcla de los dos, con características muy propias como la textura, la cantidad de alcohol y el sabor dulce. En Colombia, existen otros tipos de bebidas fermentadas derivadas del maíz como es el caso de la chicha y el guarapo, conocidas ampliamente sobre todo en las regiones rurales, en donde estas bebidas son utilizadas para realizar celebraciones y fiestas, o simplemente sirven como bebida refrescante para el campesino.

Debido a los inconvenientes presentados por intoxicación con la chicha, se reglamentó su producción y consumo con la Ley 34 de 1948 y el decreto 4194 de comienzos del siglo XX. Se realizó un estudio (Beltrán, y otros, 2006), en donde se caracterizó la chicha a nivel físico-químico y microbiológico, obteniendo los resultados mencionados en la tabla 2.

Tabla 1. Propiedades de los excipientes escogidos como conservantes y/o estabilizantes para la formulación de masato

ADITIVO	CONCENTRACION	FUNCIÓN	BENEFICIOS
Sorbato de potasio	0,1 - 0,3%	Conservante	Más soluble que las otras sales
Extracto de canela	0,01%	Conservante, saborizante	Inocuos para el organismo
Extracto de clavo	0,01%	Conservante, saborizante	

Fuente: La autora, 2010

Tabla 2. Resultados de la caracterización de la chicha

Parámetro	Valor encontrado	Observaciones	
NMP Coliformes fecales	<3	Indican que el proceso de fermentación inhibe el crecimiento bacteriano, el proceso se realiza bajo condiciones de calidad y BPM	
<i>Salmonella</i>	Negativo		
Recuento de <i>Bacillus Cereus</i>	<100	Materias primas (maíz) libres de contaminación	
Recuento de mohos	<1000	Indican que los mohos son menos exigentes que las bacterias, crecen en lugares muy húmedos y oscuros y se favorecen por la acidez propia de la bebida. Se recomienda utilizar sustancias químicas que inhiban su crecimiento y mejorar las condiciones de almacenamiento final	
Fisicoquímicos	pH	3.44	
	°A	3.35	Se obtiene luego de 15 días de fermentación
	°Brix	3.37	
Tiempo de vida útil	10 días luego de lograda la fermentación		

Fuente: Beltrán Edgar y otros. DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LA "CHICHA" PRODUCIDA EN LA LOCALIDAD SANTA FE EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C. DURANTE EL PRIMER SEMESTRE DE 2006

También, existen otros tipos de bebidas fermentadas a base de cereales, las cuales se considera que tienen poderes estimulantes y sirvieron de medicina para los ancestros, como BOZA, una bebida tradicional de Turquía y otros países del norte y sur de África y Europa que se diferencia en la forma de preparación (Arci, y otros, 2002) que tiene características similares a las del masato en Colombia y está elaborada con una mezcla de cereales entre ellos arroz y maíz. En esta bebida se han encontrado *Lactobacillus Leuconostoc*, *Lactobacillus spp*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, entre otros. Se determinaron también los cambios microbiológicos y químicos encontrando una disminución del pH, aumento en el porcentaje de acidez y de etanol, aumento en las cantidades formadoras de colonia de las bacterias ácido-lácticas y levaduras. También se determinó que esta bebida tiene altos contenidos nutricionales, como se muestra en la tabla 3 y que su vida útil es 10 días en refrigeración.

Además, se han realizado estudios del efecto del ácido láctico sobre el contenido de la microflora patógena de alimentos tradicionales africanos comprobando una disminución de patógenos contaminantes (*Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*) de 10^8 a 10^3 UFC/mL. Asimismo, demostró que el consumo de papillas ácidas producidas por fermentación contribuyó a mejorar la resistencia a trastornos gastrointestinales en niños del continente africano (Sedano Bautista, 2006).

Existe otro tipo de masato de origen peruano, en donde la base es la yuca, masticada o no por el preparador. A este masato se realizó un estudio en donde se identificaron cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus coryniformis*. Se evaluaron las cepas productoras y se encontró que el *Lactobacillus plantarum M4* fue la única cepa productora de una sustancia antimicrobiana que no es ácido orgánico ni agua oxigenada. Se demostró además, que la sustancia antimicrobiana neutralizada a pH 6,5 posee un reducido espectro antimicrobiano y es

estable en un amplio rango de temperatura y pH. Las cepas de *Lactobacillus* muestran un nivel de tolerancia de etanol hasta de un 12%v/v (Sedano Bautista, 2006)

Tabla 3. Composición promedio de Boza

Componente	Porcentaje
Sólidos totales	26.30
Sólidos solubles	19.10
Sólidos insolubles	7.20
Azúcar invertido	6.20
Azúcares totales	15.10
Dextrina	1.00
Nitrógeno	1.23
Cenizas	0.15
Fibra dietaria	0.02
Aceite crudo	0.25
Acidez	0.3 – 0.5
Ácidos volátiles	0.04 – 0.13
Alcohol	<0.6
Vitaminas	mg/100g DM
Tiamina (Vitamina B1)	0.19 – 0.25
Riboflavina (Vitamina B2)	0.18 – 0.21
Piridoxina (Vitamina B6)	0.32 – 0.36
Nicotinamida	0.51 – 0.60

Fuente: Arci Muhammet y Daglioglu Orhan. Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional turkish food

En México, también existe un amplio interés por la formulación de bebidas fermentadas con contenidos de probióticos debido a los problemas de desnutrición y retraso en el crecimiento debido a un alto índice de diarreas y vómitos. Se realiza el estudio sobre *L. casei-shirota* y se encontraron muestras con composición nutritiva alta y sensorialmente aceptado (Guzmán, y otros).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de masa de maíz para el consumo humano, genera gran cantidad de residuos líquidos, los cuales son altamente contaminantes al ser desechados sin ningún tratamiento. Al analizar visualmente dichos residuos, se encuentra que poseen sólidos suspendidos, y se plantea la posibilidad de transformar los residuos en un nuevo producto, como lo es el masato.

Además, la formulación de este producto necesita optimizar recursos y procedimientos para el manejo y aprovechamiento de la suspensión resultante de la cocción del maíz que consta de trozos de maíz y almidones apto para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos que pueden originar la fermentación deseada.

Por tanto, se plantea la formulación de una bebida derivada de la fermentación del maíz y otros cereales denominada “masato”, teniendo en cuenta los inconvenientes tecnológicos como el envase y el corto tiempo de vida útil, debido a la fermentación que se origina por microorganismos cuyo crecimiento es necesario controlar luego de obtener las características organolépticas deseadas del producto.

4 METODOLOGÍA

4.1 Materiales y Equipo

4.1.1 Materiales

- Extracto alcohólico de clavo: posee un elevado contenido de aldehídos, ácido benzóico y eugenol, los cuales se ha comprobado (Arias, 2006) que tienen efecto antibacteriano, los cuales pueden actuar sobre flora patógena que pueda contaminar el producto. También se emplea como saborizante, pues en combinación con la canela le ofrecen unas características sensoriales propias del masato. Se emplea en concentraciones de mínimo 0,01%
- Extracto alcohólico de canela: sus características son similares a las del extracto de clavo y canela, con diferencia que contiene o-metoxicinamaldehído y aceite de canela. (Arias, 2006).
- Sorbato de potasio: Se emplea como conservante, puesto que es la más soluble de todas las sales del ácido sórbico. Tiene propiedades fungiestáticas (inhibe la enolasa y lactodeshidrogenasa y otras enzimas que participan en el ciclo de Krebs). Tiene acción frente a levaduras, mohos, hongos, que pueden atacar el producto, por las características propias del producto en cuanto a humedad. Actúa en pH débilmente ácidos, cercanos al neutro. Se emplea en bebidas fermentadas en concentraciones entre 0,01% y 0,03%.
- Sacarosa: Se emplea principalmente como edulcorante y como sustrato de las bacterias ácido-lácticas, en una concentración entre 10 y 20%

4.1.2 Equipos

- Medidor de pH marca Hanna Instruments, modelo HI99163 con electrodo de vidrio.
- Acidímetro
- Marmitas con capacidad de 125 L
- Licuadora marca Oster

4.2 Especificación metodológica

4.2.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental tipo Plackett-Burman para la evaluación de 3 aditivos y 2 condiciones de almacenamiento diferentes luego de ser preparado el masato, con un total de 8 muestras diferentes, con el fin de realizar distintos ensayos y encontrar la fórmula que más se adecue a la calidad organoléptica que se desea, teniendo en cuenta la presencia (nivel alto) o ausencia (nivel bajo) de cada uno de los factores, escogida de forma aleatoria.. En la tabla 6, se muestra la matriz empleada para el estudio.

El diseño experimental de Plackett-Burman es un diseño de experimentos multifactoriales óptimo, puesto que con pocos tratamientos se puede evaluar un múltiplo de cuatro o más variables. Es muy eficiente al realizar un barrido en donde se desean observar los efectos principales que se producen en un experimento, los cuales pueden ser atribuidos a diferentes factores. (NIST/SEMATECH). Este diseño se basa en la comparación entre las respuestas experimentales de cada factor, para determinar la influencia del mismo en el efecto evaluado, la cual se valoró mediante el siguiente modelo matemático:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_n X_n$$

En donde

Y: Variable respuesta

n: numero de factores (en este caso 5)

β : Incidencia de cada factor sobre la variable respuesta

X: Factor evaluado

Al emplear este método se obtuvieron resultados con nivel de confianza de 95%.

Tabla 4. Matriz con variables para distribución en los ensayos.

	BASE	PASTEURIZACIÓN	EXTRACTO DE CLAVO	SORBATO	REFRIGERACIÓN	CANELA
1	+	-	+	+	-	+
2	+	+	-	+	+	-
3	+	+	+	-	+	-
4	+	-	+	+	-	+
5	+	-	-	+	+	+
6	+	+	-	-	+	-
7	+	+	+	-	-	+
8	+	-	-	-	-	-

Fuente: La autora, 2009

Las condiciones de los niveles altos (+) y bajo (-) de los efectos de cada variable se mencionan a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de niveles altos y bajos de los efectos de cada variable

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Pasteurización	Si	No
Extracto de clavo	0,1%	0
Sorbato de potasio	0,5 mg/mL	0
Refrigeración	Si	No
Canela	0,1%	0

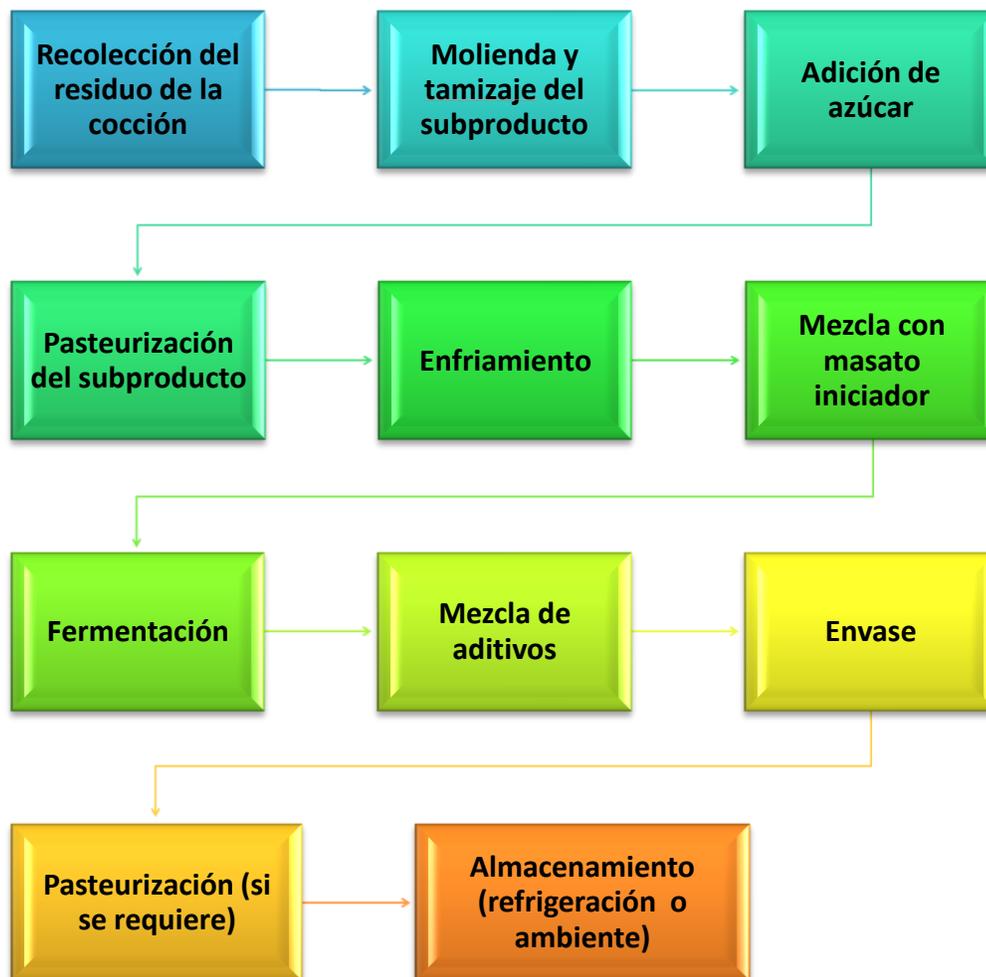
Fuente: La autora, 2010

Se presentaron 8 formulaciones que fueron evaluadas frente a un conjunto de variables respuesta que incluyen los factores críticos que presenta el masato, principalmente para su conservación (pH, grados Brix, grados de etanol, análisis microbiológico de hongos y levaduras, mesófilos y coliformes).

Las variables de pasteurización se refieren al sometimiento del producto luego de ser envasado a dicho procedimiento y refrigeración en el tiempo de almacenamiento.

4.2.2 Procedimiento

Figura 2. Diagrama de procedimiento para la elaboración de masato



Fuente: La autora, 2010

1. Recoger la suspensión que queda luego de la cocción del maíz en cajones y se dejó sedimentar por el lapso de 1 hora.
2. Licuar el sedimento por el lapso de 45 segundos para homogenizar el tamaño de partícula y se tamizó.
3. Adicionar del azúcar (al 10%)
4. Pasteurizar a 80°C durante 8 minutos
5. Enfriar en baño de agua hasta 60°C
6. Mezclar con masato fermentado previamente obtenido con cultivos lácticos y levadura comercial, en proporción de 4:6 (fresco: fermentado)
7. Permitir la fermentación durante 24 horas, en una temperatura promedio de 33°C.
8. Preparar cada formulación mezclando con cada uno de los aditivos pertinentes.
9. Envasar en frasco de polietileno con capacidad de 230 mL.
10. Someter las muestras que requerían pasteurización (muestras 2,3,6,7) a 80°C durante 5 minutos.
11. Almacenar las muestras: en refrigeración para las muestras 2,3,5,6 y en temperatura ambiente las muestras 1,4,7,8.
12. Realizar la caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial a los 7 días y 15 días.

4.3 Metodología de análisis

- 4.3.1 Determinación de pH:** se empleó un medidor de pH con electrodo de vidrio marca Hanna Instruments, modelo HI99163
- 4.3.2 Determinación de grados Brix:** se empleó un medidor refractómetro de grados Brix en escala apropiada.
- 4.3.3 Determinación de sólidos totales:** mediante secado por estufa.
- 4.3.4 Determinación de grados de alcohol:** se realizó una destilación para determinar la cantidad total de alcohol, conforme a la metodología establecida por el INVIMA
- 4.3.5 Análisis microbiológico:** se realizaron pruebas de rutina para detección de mesófilos totales, coliformes totales, hongos y levaduras y bacterias acidolácticas, metodología establecida por el INVIMA.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de las condiciones de fermentación del masato

Teniendo en cuenta que el masato se obtiene por la fermentación espontánea del maíz u otros cereales, se permitió la fermentación de una muestra de los residuos de la cocción del maíz de acuerdo con la tabla 6, sin embargo no se obtuvo un resultado favorable, motivo por el cual fue necesario inocular con cultivos lácticos y levadura en proporción de 0,5g/1Kg.

Se realizó la caracterización física y microbiológica del sustrato y se evaluó pH y acidez a los ensayos realizados, obteniendo los resultados registrados en la tabla 7. Al realizar la comparación de los resultados obtenidos, se encuentra que microbiológicamente el residuo contiene una gran cantidad de microorganismos competidores que no permiten el crecimiento de las bacterias ácido – lácticas nativas del medio. Lo anterior explica la razón de pasteurizar e inocular bacterias y levaduras para propiciar la fermentación, lo cual se confirma al comparar los resultados del ensayo 1 con los tres restantes.

El porcentaje de azúcar influye notablemente, pues en exceso existe una saturación de las enzimas que degradan el sustrato y por consiguiente no existe fermentación, lo cual se pudo evidenciar claramente en el ensayo 1, en donde se empleó un porcentaje de 18%, puesto que de acuerdo a la literatura ((Arci, y otros, 2002), (Beltrán, y otros, 2006)), se indica que éste puede variar entre el 10 y el 20%. Sin embargo, para este caso, fue evidente que las bacterias emplean únicamente el 10%, posiblemente porque el contenido de azúcares que tiene el residuo de cocción es elevado.

En la tabla 6 también es posible evidenciar que la cantidad de sobrenadante es muy importante para el desarrollo de la fermentación, puesto al comparar los ensayos 2 y 3, en donde las condiciones de temperatura y porcentaje de azúcar son las mismas, se tiene un tiempo de fermentación más rápido, con características de pH y acidez muy diferentes, siendo mejores para el ensayo 3 que para el ensayo 2.

La temperatura es un factor significativo, pues las bacterias empleadas son termófilas, lo cual se evidencia en los tiempos de fermentación, a menor temperatura, se tardaron más tiempo en la fermentación, mientras que a mayor temperatura, se disminuyó.

Tabla 6. Ensayos para determinar las condiciones de fermentación del masato

Factores	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
Sobrenadante sedimento	7:3	7:3	2:8	2:8
% azúcar	18%	10%	10%	10%
Temperatura	18°C	30°C	30°C	35°C
Cultivos iniciadores	No	No	Si	Si
Pasteurización	No	Si	Si	Si

Fuente: La autora, 2010

5.2 Preparación de las muestras

Luego de determinar las condiciones de fermentación se realizaron las muestras de acuerdo con el procedimiento establecido, luego de 6 días de preparación se encontraron los resultados publicados en la tabla 9.

Al realizar la comparación entre el porcentaje de acidez en función de la pasteurización las botellas que no fueron pasteurizadas disminuyeron su acidez inicial, mientras que las que se pasteurizaron la conservaron o la aumentaron. Esto se debe a que en las muestras que se pasteurizaron, se detuvo el crecimiento microbiano y por consiguiente la fermentación, por lo tanto la acidez se mantuvo; mientras que en las no pasteurizadas, la acidez disminuyó, ya que se metabolizaron los azúcares en ácidos titulables y en CO₂. Al comparar la el porcentaje de acidez con respecto a la adición de

clavo, sorbato de potasio, y canela no hubo mayor efecto sobre este parámetro.

Al comparar el porcentaje de acidez con la adición de conservante (clavo, canela y/o sorbato de potasio), se puede evidenciar que existe un efecto protector, teniendo en cuenta que para los que se almacenaron a temperatura ambiente y no fueron pasteurizadas (muestras 1, 4 y 8) el porcentaje de acidez fue menor en la muestra que no se adicionó ningún conservante (muestra 8); igualmente se observa que en la 7, que fue almacenada a temperatura ambiente luego de ser pasteurizada, no hubo modificación del porcentaje de acidez, lo cual posiblemente fue causado por el efecto protector que ejerce la combinación entre los extractos de canela y clavo, puesto que la actividad enzimática y las condiciones a las que se encuentran expuestos las diferentes sustancias presentes en el masato, es posible que se presentara oxidación de las mismas, la cual se tradujo en efectos negativos sobre las características sensoriales del producto. Por tal razón, es muy importante el empleo de este tipo de aditivos, que tienen un efecto protector sobre el producto además de actuar como conservantes.

Teniendo en cuenta que el recuento de coliformes totales es un indicador de las buenas prácticas de manufactura, se obtuvo evidencia que durante el proceso se aplicaron de manera conveniente.

La cantidad de mesófilos se redujo cuando la muestra se sometió al proceso de pasteurización, y no se observó ningún cambio apreciable en comparación con los otros parámetros microbiológicos evaluados individualmente, sin embargo es posible apreciar un efecto de sinergia entre la adición de sorbato y la refrigeración en la muestra 2, al igual que clavo y canela en la muestra 7, teniendo en cuenta que la cantidad de mesófilos es menor a 1000.

Es necesario aclarar la importancia disminuir la carga inicial del producto, pues de cualquier manera, los resultados microbiológicos son muy elevados y no podría brindarse una excelente calidad del producto. Para ello, se realizó la recomendación en la planta de alimentos en donde se realizaron los ensayos de manera que se intensificaran los controles sobre los procedimientos de limpieza y desinfección tanto del área, como de cada uno de los elementos empleados para la obtención de maíz y

evitar la contaminación cruzada, luego de realizar un análisis sobre las posibles causales de contaminación del producto, debido a que no solo se verá afectada la calidad del masato, sino de los productos que actualmente se fabrican y comercializan.

Tabla 7. Resultados de los análisis realizados a los ensayos para determinar las condiciones de fermentación del masato

	Base	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
pH	6,21	3,48	4,24	6,91	6,96
Acidez (*)	0,12	0,99	0,56	0,33	0,35
Tiempo de fermentación	N.A.	72 horas	72 horas	48 horas	24 horas
Mesófilos aerobios (**)	>300.000				
Mohos y levaduras (**)	>200.000				
Coliformes totales (**)	460		No evaluado		
Coliformes fecales (**)	<3				
Recuento de bacterias ácido lácticas	956.000				

Fuente: La autora, 2010

La producción de CO₂ se vio afectada por la pasteurización, ya que en la mayoría de las muestras que fueron sometidas a este procedimiento, no hubo producción de gas. Esto ocurre como se explicó anteriormente porque se disminuyó la actividad microbiana, lo cual impidió la metabolización de los carbohidratos y la producción de ácidos. En las muestras que fueron almacenadas a temperatura ambiente y se les adicionó la mezcla de los tres conservantes (1 y 4) no se observó un efecto significativo de los mismos sobre dicho parámetro. Por tanto, es posible concluir que el proceso de pasteurización es indispensable para evitar la producción de gas.

Se observó además que las muestras que fueron pasteurizadas no presentaron sedimentación, lo cual se puede explicar por la formación de redes, producto de la

gelificación del almidón contenido en la muestra.

Tabla 8. Resultados obtenidos para las diferentes formulaciones. Comparación con los factores elegidos.

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8
%acidez (% ácido láctico)	0,25	0,47	0,40	0,23	0,26	0,35	0,37	0,17
Sólidos totales (%)	15,0	14,9	15,0	14,8	14,8	14,9	14,8	14,9
Sólidos solubles (%)	11,0	10,4	10,4	10,2	10,4	10,4	10,8	10,5
Alcohol (%)	0	0	0	0,07	0,13	0	0	0
Coliformes totales (NMP/g)	4	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Mesófilos (UFC/g) x 10 ³	>300	<1	11,2	>300	>300	8,4	<1	>300
Producción CO ₂	+	-	-	+	-	-	-	+
Sedimento	+	-	-	+	+	-	-	+

Fuente: La autora, 2010

Como el planteamiento del análisis estadístico utilizó el estadístico t de Plakett - Burman, los resultados indicaron que todas las variables en consideración afectan al producto, lo que sugiere que se deben establecer los parámetros mínimos para cada uno de ellos, de forma que la interacción entre ellos den como resultado de un producto apto para el consumo. En la tabla 9 se encuentran registrados los resultados del estadístico en mención.

Al inicio del trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

- ✓ Hipótesis nula (H₀): no hay diferencia estadísticamente significativa entre los ensayos.
- ✓ Hipótesis alterna (H₁): existe diferencia estadísticamente significativa entre los ensayos.

Al existir diferencia entre los ensayos, implica que el factor evaluado tiene incidencia en la respuesta obtenida, como se muestra en la tabla 9 y cuyos valores importantes están en negrilla.

Tabla 9. Resultados obtenidos de t calculado luego de aplicar el análisis estadístico de Plakett-Burman

	Pasteurización	Extracto de clavo	Sorbato de potasio	Refrigeración	Extracto de canela
ACIDEZ	6,2450	0,0000	-0,7347	4,2246	-2,5715
S. TOTALES	3,5818	3,5818	3,5750	3,5818	3,5681
S. SOLUBLES	3,5698	3,6087	3,5698	3,5310	3,6087
ALCOHOL	0,0000	1,7551	5,0147	3,2596	5,0147
PRODUCCIÓN CO ₂	-1,4856	4,4567	4,4567	-1,4856	4,4567
SEDIMENTO	-1,0243	3,0729	5,1215	1,0243	5,1215
t tabulado			2,7765		

Fuente: La autora

Se esperaba en los resultados obtenidos en las respuestas para los diferentes ensayos (tabla 9) fueran estadísticamente diferentes, sin embargo, se obtuvieron resultados muy similares en el caso de sólidos totales y sólidos solubles. Por otra parte, no se encontró alcohol en la mayoría de las muestras, por tanto en casi todos los casos la respuesta es cero. Esto afecta significativamente las respuestas obtenidas, puesto que la base fundamental del diseño experimental de Plakett – Burman es que las respuestas sean diferentes, para poder obtener un nivel de confianza del 95%.

A partir de la tabla 9, es posible concluir que la **pasteurización** tiene efecto sobre la **acidez**, puesto que al pasteurizar, se evaporarán los compuestos volátiles, de tal manera que se reduce, además se inhibe la actividad de algunas enzimas causantes de la degradación de los azúcares para su conversión en ácidos. También tiene efecto sobre los **sólidos totales y los sólidos solubles totales**, puesto que al realizar una pasteurización prolongada, se produce evaporación y por consiguiente aumento de los sólidos. En cuanto al efecto sobre la producción de alcohol, producción de CO₂, y

sedimentación del producto, los resultados obtenidos no permiten concluir que influyen significativamente, sin embargo de acuerdo al análisis individualmente para cada ensayo, es posible afirmar que si influye en la sedimentación y en la producción de CO₂.

El efecto que tiene el **extracto de clavo** individualmente tiene efecto significativo sobre el los sólidos, la producción de CO₂ y la sedimentación. En todos los casos es un efecto favorable, por cuanto brindó un efecto protector evitando que se produjera cambios en el producto, evitando la sedimentación, la producción de CO₂ y la transformación de sólidos totales en sólidos solubles.

El sorbato de potasio tiene efecto sobre todos los parámetros evaluados, excepto para la acidez.

Finalmente, se rechaza la hipótesis nula, porque las variables evaluadas si inciden en la respuesta que se obtiene al producir un masato con las condiciones en que se hicieron los ensayos

5.3 Preparación de la formulación final

Una vez realizados los análisis de cada una de las formulaciones, y tomar las medidas respectivas en la planta, se procedió a efectuar una formulación final, la cual tiene las características enumeradas en la tabla 10.

Se adicionó extracto de clavo y canela en proporción al 0,1%, para acentuar el sabor. A esta formulación también se le realizaron análisis microbiológicos y fisicoquímicos propuestos. Los resultados se encuentran indicados en la tabla 11.

Tabla 9. Condiciones de fermentación para la elaboración de la formulación final de masato.

Condiciones	Valores
Tiempo de fermentación	5 días
Temperatura de fermentación	30°C
Porcentaje de azúcar	10%
Porcentaje de sedimentación	3:7
Concentración de clavo y canela	0,2%
Pasteurización inicial	Si
Pasteurización final	Si
Refrigeración	Si

Fuente: La autora, 2010

Teniendo en cuenta el tiempo de vida útil del producto final, sin la adición de sorbato de potasio, es posible afirmar que el empleo de esta sustancia química no es necesario para la elaboración del masato.

Tabla 10. Resultados obtenidos en la formulación final de masato

Parámetro	Valor
%acidez (% ácido láctico)	0,25
Coliformes totales (NMP/g)	<3
Mesófilos (UFC/g) x 10 ³	>300
Recuento de bacterias ácidolácticas (número mínimo viable)	2,2 x 10 ⁶
Producción CO ₂	-
Sedimento	-

Fuente: la autora, 2010

6 CONCLUSIONES

La operación de pasteurización al inicio y al final de la obtención del producto es un factor determinante para prolongar la vida útil y las características sensoriales.

Para la fermentación del producto es necesario adicionar azúcar al 10%.

La adición de esencia de clavo y canela dificultan la oxidación, favoreciendo las características sensoriales del producto y su conservación.

Se corroboró que la fermentación se debe a dos tipos de microorganismos: bacterias ácido - lácticas y levaduras.

Una formulación apropiada requiere adición de clavo, canela y realizar pasteurización; así mismo, la adición de clavo y canela debe realizarse en mayor proporción para acentuar estos sabores en el producto.

Teniendo en cuenta el tiempo de vida útil del producto final, sin la adición de sorbato de potasio, es posible afirmar que el empleo de esta sustancia química no es necesario para la elaboración del masato.

Fue posible desarrollar un producto nuevo a partir del subproducto de la cocción de maíz con el fin de evitar los problemas planteados, como la contaminación de las fuentes receptoras y evitar el tratamiento previo de los residuos.

7 RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar con mayor precisión los tiempos de fermentación.

Se necesita realizar un aislamiento y recuento de microorganismos presentes en el producto con el fin de mejorar la fermentación y estandarizar los procedimientos de elaboración a partir del inóculo.

8 AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, es más que necesario agradecer a Dios por permitirme llegar hasta la culminación de esta etapa de mi vida.

También tengo que agradecer a la empresa Inversiones Coarali S.A. en cabeza del Señor José Antonio Velásquez, quien generó la inquietud de continuar mis estudios, brindándome apoyo para la elaboración de este proyecto.

Al personal del laboratorio de microbiología del ICTA, en cabeza de la Profesora Martha Holguín por su guía, dirección y apoyo.

9 BIBLIOGRAFÍA

Aidoo K., Rob M. J. y Sarkar P. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods [Publicación periódica]. - [s.l.] : Federation of European Microbiological Societies. Blackwell Publishing Ltd., 2006. - Vol. 6.

Arci Muhammet y Daglioglu Orhan BOZA: A LACTIC ACID FERMENTED CEREAL BEVERAGE AS A TRADITIONAL TURKISH FOOD [Publicación periódica] // FOOD REVIEWS INTERNATIONAL. - Turquía : [s.n.], 2002. - 1 : Vol. 18. - Artículo PDF, consultado vía electrónica.

Arias F.C. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos del laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario [Publicación periódica]. - Pamplona : BISTUA, 2006. - 2 : Vol. 4.

Beltrán Edgar [y otros] DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LA “CHICHA” PRODUCIDA EN LA LOCALIDAD SANTA FE EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C. DURANTE EL PRIMER SEMESTRE DE 2006 [Electrónico]. - Bogotá : [s.n.], 2006.

CHEIKHYOUSSEF Ahmad [y otros] Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602 [Publicación periódica] // Food Control. - 2009. - 20. - Documento consultado vía electrónica.

Escamilla María Producción de Diacetilo y otros compuestos aromatizantes relacionados, por bacterias lácticas en cultivos axénicos mixtos a base de maíz [Informe]. - [s.l.] : Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas, 2000.

Guzmán Juan, Cárdenas Sofía y Valdez Zaidy FORMULACIÓN DE BEBIDAS FERMENTADAS UTILIZANDO UN PROBIÓTICO (*Lactobacillus casei-shirota*), EZAL Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MIEL Y POLEN [Informe] / Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

KLINBERG Trine Danø [y otros] Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages [Publicación periódica] // International Journal of Food Microbiology. - 2005. - Vol. 105.

MERCK The Merck Index [Libro]. - [s.l.] : Merck, 2006. - Vol. 14th Edición.

Mollendorff J. W., Todorov S. D. y Dicks L. M. T. Comparison of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula [Publicación periódica]. - South Africa : Current microbiology, 2006. - Vol. 53.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods [En línea]. - NIST/SEMATECH . - 16 de JULIO de 2009. - <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri335.htm>.

Schwan R. [y otros] Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil [Publicación periódica]. - [s.l.] : Federation of European Microbiological Societies. Blackwell Publishing Ltd, 2007. - Vol. 7.

Sedano Bautista José Luis Selección de cepas nativas de lactobacillus con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de "masato". [Informe]. - Lima, Perú : [s.n.], 2006.

Shrestha H., Nand K. y Rati E. MICROBIOLOGICAL PROFILE OF MURCHA STARTERS AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF POKO, A RICE BASED TRADITIONAL FERMENTED FOOD PRODUCTO OF NEPAL [Publicación periódica]. - [s.l.] : FOOD BIOTECHNOLOGY, 2002. - 1 : Vol. 16.

Vicent María, Álvarez Silvia y Zaragoza Jose Química Industrial Orgánica [Sección del libro]. - [s.l.] : Ed. Universidad Politécnica de Valencia, 2006.