

16  
20/1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIOS SOBRE LA ACIDIFICACION DE  
ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAIZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ADRIANA ESMERALDA FLORES PIÑA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

1998.

REGISTRO

262656 -



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Prof. Eduardo Bárzana García.  
VOCAL: Prof. Agustín López-Munguía Canales.  
SECRETARIO: Prof. María del Carmen Wachter Rodarte.  
1er. SUPLENTE: Prof. José Mariano García Garibay.  
2o. SUPLENTE: Prof. Amelia Ma. de Gpe. Farres González.

Trabajo que se desarrolló en:

Laboratorio 324 del Conjunto " E "de  
la Facultad de Química de la UNAM.

**ASESORA**

*Ma. del Carmen Wachter*

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

**SUPERVISOR TÉCNICO**

*Rocio Santillana Hinojosa*

M en C. Ma. del Rocio Santillana Hinojosa

**SUSTENTANTE**

*Adriana Esmeralda Flores Piña*

Adriana Esmeralda Flores Piña

## ÍNDICE

Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vii
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
El maíz	6
Estructura del grano	6
Composición del grano	8
El almidón de maíz	8
Carbohidratos del maíz	11
Germinación	13
Las amilasas	15
$\alpha$ -amilasa	17
$\beta$ -amilasa	18
Otras amilasas	18
Nixtamalización	19
Alimentos fermentados de maíz	21
Alimentos fermentados de maíz de otras partes del mundo	22
Bacterias lácticas	25
Objetivos	27
Materiales y Métodos	28
1. Fermentación de maíz con diferentes tipos de tratamiento	28
1.1. Preparación de sustratos	28
1.1.1. Tratamientos del maíz	28
1.1.1.1. Maíz con remojo (kenkey)	28
1.1.1.2. Maíz con la adición de una fuente de amilasas (mahewu)	28
1.1.1.3. Maíz germinado (tesgüino)	29
1.1.1.4. Maíz nixtamalizado (pozol)	30
1.1.2. Ajuste de humedad	30
1.1.3. Esterilización de los sustratos	31
1.2. Determinación de la actividad amilolítica de la harina de trigo utilizada como fuente de amilasas	31

1.3. Microorganismo utilizado	33
1.4. Conservación del microorganismo	34
1.5. Preparación del inóculo	35
1.6. Inoculación del microorganismo	36
1.7. Sistema de fermentación	36
1.8. Muestreo	36
1.9. Análisis realizados a todas las muestras de maíz	37
1.9.1. Análisis microbiológicos	37
1.9.1.1. Determinación del crecimiento microbiano	37
1.9.2. Análisis fisicoquímicos	37
1.9.2.1. Determinación de pH	37
1.9.2.2. Acidez titulable	38
1.9.2.3. Cuantificación de hidratos de carbono	38
1.9.2.3.1. Procedimiento de extracción y clarificación	38
1.9.2.3.2. Cuantificación enzimática de carbohidratos simples	39
1.9.2.4. Cuantificación de oligosacáridos por HPLC	40
1.9.2.4.1. Preparación de los estándares de oligosacáridos	40
1.9.2.4.2. Preparación y análisis de muestras	40
1.9.2.5. Cuantificación de ácidos por HPLC	41
1.9.2.5.1. Preparación de los estándares de ácidos	41
1.9.2.5.2. Preparación y análisis de ácidos de muestras	42
Resultados y Discusión	43
1. Fermentación de maíz con diferentes tipos de tratamiento	43
1.1. Contenido y diferencias de hidratos de carbono y oligosacáridos en el maíz después de los tratamientos	43
1.2. Diferencias en el crecimiento microbiano y acidificación de las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos	48
Conclusiones	60
Recomendaciones	61
Apéndices	62
Apéndice 1. Medios de Cultivo	62
Apéndice 2. Principio de los sistemas enzimáticos para la cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa	64
Apéndice 3. Datos de las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos	68
Bibliografía	70

## LISTA DE TABLAS

No.	Título	Página
1	Principales azúcares constituyentes del grano de maíz en peso seco	12
2	Algunos alimentos fermentados de maíz mexicanos	23
3	Alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo	24
4	Porcentaje de humedad y volumen de agua añadido a las masas	31
5	Curva patrón de glucosa por el método de DNS	32
6	Datos de absorbancia y concentración de glucosa obtenidos para la reacción enzimática con respecto al tiempo	33
7	Patrón de fermentación de azúcares por medio del sistema API50CH (BioMérieux) de <i>L. plantarum</i> a las 24 h de incubación a 29°C	34
8	Concentraciones de los azúcares encontrados al inicio y final de las fermentaciones con maíz sometido a diferentes tratamientos	46
9	Concentraciones de los oligosacáridos encontrados al inicio y final de las fermentaciones con maíz sometido a diferentes tratamientos	47
10	Concentraciones de los ácidos encontrados a lo largo de las fermentaciones de maíz sometido a diferentes tratamientos	53
11	Datos reportados de azúcares, acidez titulable y pH para algunos alimentos fermentados de maíz	56
12	Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de glucosa y fructosa	65
13	Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de maltosa/ sacarosa/glucosa	65
14	Cambios de pH y crecimiento microbiano de <i>L. plantarum</i> amilasa (-) durante la fermentación en maíz remojado incubada a 30°C.	68
15	Cambios de pH y crecimiento microbiano de <i>L. plantarum</i> amilasa (-) durante la fermentación en maíz + amilasas incubada a 30°C.	68
16	Cambios de pH y crecimiento microbiano de <i>L. plantarum</i> amilasa (-) durante la fermentación en maíz germinado incubada a 30°C.	69
17	Cambios de pH y crecimiento microbiano de <i>L. plantarum</i> amilasa (-) durante la fermentación en maíz nixtamalizado incubada a 30°C.	69
18	Cambios en la acidez titulable de <i>L. plantarum</i> amilasa (-) durante las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos incubadas a 30°C.	69

## LISTA DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	Corte longitudinal de un grano de maíz	7
2	Apariencia microscópica de gránulos de almidón de varios cereales	9
3	Gránulos de almidón de maíz observados con diferentes aumentos	10
4	Porción de una molécula de amilosa mostrando las unidades de $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces $\alpha$ -(1,4).	16
5	Porción de una molécula de amilopectina	17
6	Preparación del maíz con remojo	28
7	Preparación del maíz con la adición de amilasas	29
8	Preparación del maíz germinado	29
9	Preparación del maíz nixtamalizado	30
10	Procedimiento de extracción y clarificación	39
11	Crecimiento microbiano de <i>L. plantarum</i> en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C	49
12	Cambios de pH durante las fermentaciones de <i>L. plantarum</i> en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C	52
13	Acidez titulable durante las fermentaciones de <i>L. plantarum</i> en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C	54

## DEDICATORIAS

A mi padre, por impulsarme en todos los momentos de mi vida. Por enseñarme a echarle ganas a todo y luchar con todas mis fuerzas para obtener lo que quiero; por enseñarme tantas cosas de la vida gracias a su experiencia. Por su gran ejemplo de amor, paciencia, honradez y carácter. Por todo esto y muchísimo más tan inexplicable.

Gracias.

A mi madre, por ser la representante de la dulzura, cariño y comprensión que todo hijo necesita; por todo el tiempo que me dedicó siendo tan paciente y amorosa conmigo. Por ser tan jovial y traviesa, haciendome repelar muchas de las veces. Sencillamente por ser mi madre.

Gracias.

A mis muy queridos abuelitos Juan y Javiera, Felipe y Victoria, Lutga y Dr. Flores G. Gracias por todo ese amor que me dieron y me seguirán dando.

A mi esposo, por ser un buen compañero y amigo. Por compartir muchos momentos difíciles y de felicidad junto a mí e impulsarme a cada momento.

Gracias.

A mi hija Mariana, ya que representas todo para mí y porque fuiste tú la que me impulsó a llevar a su fin este gran sueño mío.

### **Hija Mía**

*cuando naciste  
te tenía entre mis brazos  
y no paraba de sonreírte  
Tú siempre me devolvías la sonrisa  
con tus grandes ojos bien abiertos  
llenos de amor  
Eras un bebé tan  
hermoso  
bueno  
dulce  
Ahora  
mientras te veo crecer  
y ser persona  
te miro  
tu risa  
tu alegría  
tu sencillez  
tu belleza  
y me pregunto que será de ti  
en quince años  
y me pregunto  
que será del mundo  
en quince años  
Y sólo espero que podrás  
gozar de una vida  
emotiva  
buena  
plena  
y llena de amor  
en un mundo de paz  
Pero más que nada  
quiero que sepas  
que estoy orgullosa de ti  
y que te quiero profundamente.*

**Susan Polis Schutz**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**A la Dra. Carmen Wachter, por brindarme mucho de su tiempo y conocimiento y ser la directora de mi tesis.**

**A todos mis compañeros de laboratorio.**

**Al Programa Universitario de Alimentos (PUAL) por ayudarme en la realización de esta tesis.**

**A CONACYT por medio del proyecto 4688N y al proyecto DGAPA IN210194 por la ayuda brindada en la realización de esta tesis.**

**Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y al Ing. Gabriel Ortiz, por su ayuda brindada para la realización de la misma.**

**A mis tíos Dr. Roberto Flores M. y Lic. Mario Héctor Flores M. y Fam.**

**A todos mis amigos y compañeros de la Generación '91.**

**A mis grandes amigas I.Q. Angélica Rodríguez, Xóchitl Díaz y Thalía H. Marino, Beatriz Ruiz y Norma S. Piña con las cuales pase momentos inolvidables.**

**A mis amigos de Primaria, Secundaria y CCH.**

## RESUMEN

El maíz representa cerca de la mitad del volumen total de alimentos que se consumen en México cada año, proporcionando la mitad de las calorías requeridas por la población. Los alimentos fermentados son una forma importante de consumo de este cereal y la acidificación producida por la acción de bacterias lácticas ocurre comúnmente durante la fermentación del maíz. La importancia del proceso de fermentación radica en la producción de aromas y sabores, así como el efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas, donde los ácidos juegan un papel importante.

El almidón es el principal carbohidrato del maíz y contiene además una baja concentración de azúcares. Con la hipótesis de que los tratamientos previos que sufre el maíz antes de su fermentación (germinación, remojo, nixtamalización, adición de sustancias amilolíticas), aumentan la proporción de azúcares simples, a partir de los cuales las bacterias lácticas realizan una buena acidificación, se plantearon como objetivos: conocer el tipo y la concentración de azúcares que se producen en el maíz con cada uno de los tipos de pretratamientos previos a la fermentación, y comparar el crecimiento de una bacteria láctica y el grado de acidificación producido por la misma en estos sustratos.

Se observó que el tratamiento previo del maíz afecta el tipo y concentración de azúcares producidos. En el maíz germinado, el remojado y al maíz que se le añadió harina de trigo como fuente de amilasas, la concentración de azúcares aumentó, mientras que en el nixtamal disminuyó. La mayor concentración de azúcares y oligosacáridos se encontró en el maíz germinado (15.8% de glucosa, 4.3% de fructosa, 29.3% de sacarosa y 20.9% de maltosa, como 1.0% de maltotriosa y 1.6% de maltotetrosa en peso seco) seguido del remojado (5.9% de glucosa, 0.9% de fructosa, 9.7% de sacarosa, 7.4% de maltosa, 0.6% de maltotriosa y 1.5% de maltotetrosa en peso seco), del maíz + amilasas (0.4% de glucosa, 0.08% de fructosa, 1.2% de sacarosa y 11% de maltosa en peso seco) y el maíz nixtamalizado (0.05% de glucosa, 0.06% de fructosa, 1.3% de sacarosa y 0.9% de maltosa en peso seco).

El crecimiento de *L. plantarum* estuvo limitado por el bajo pH alcanzado debido a la producción de ácidos más que por la concentración de azúcares. En contraposición, la concentración de ácidos producidos (láctico y acético) dependió de la concentración inicial de azúcares, con la excepción del maíz nixtamalizado en la que se obtuvieron concentraciones similares a las del maíz + amilasas, a pesar de su menor concentración de azúcares. El crecimiento de *Lactobacillus plantarum* se inhibió en el maíz germinado durante las primeras horas de fermentación posiblemente debido a la alta concentración de azúcares. Se obtuvo la mayor velocidad de acidificación con el maíz remojado. Se produjeron diferentes concentraciones de ácido acético y láctico a partir de los azúcares presentes, teniendo muy diferentes relaciones láctico/acético dependiendo del pretratamiento: remojo 7.7, adición de amilasas 12, germinación 1.6 y nixtamalización 2.3.

## INTRODUCCIÓN

El maíz es originario del continente americano. La importancia de este cereal ha sido tan grande que representa cerca de la mitad del volumen total de alimentos que se consumen en México y proporciona aproximadamente la mitad de las calorías requeridas, sobre todo entre la población de bajos ingresos (Museo Nacional de Culturas Populares, 1987). La importancia del maíz no se restringe a su uso alimentario; para nuestras culturas indígenas es sagrado y se le atribuye un papel importante en el origen de la vida. Para asegurar y mejorar el uso del maíz se ha transmitido de generación en generación el conocimiento popular sobre la práctica de su cultivo, su importancia cultural, social y su uso en la alimentación.

La acidificación debida a la acción de las bacterias lácticas es el fenómeno que más comúnmente ocurre durante la fermentación natural del maíz. Uno de los beneficios principales de esta fermentación es la producción de aromas y sabores, en los que contribuyen significativamente la concentración y el tipo de ácidos producidos. Por otro lado, se ha reportado que los ácidos son en gran parte responsables de una acción antimicrobiana, que elimina microorganismos indeseables, como son las bacterias patógenas. Se ha demostrado que estos alimentos pueden jugar un papel importante para contrarrestar infecciones bacterianas, sobre todo diarreas infantiles en países en vías de desarrollo. En condiciones de higiene deficiente, estos productos son por lo tanto sustitutos de alimentos de destete más seguros que los basados en la leche de animales domésticos (Mensah *et al.*, 1991; Nout *et al.*, 1989).

Para lograr la producción de aromas y el efecto antimicrobiano mencionado, debe asegurarse una acidificación eficiente del maíz por las bacterias lácticas. Las bacterias lácticas producen ácidos a partir de sustratos que son generalmente carbohidratos simples (monosacáridos y disacáridos). También se ha demostrado que algunas son capaces de hidrolizar el almidón (Pompeyo *et al.*, 1993; Giraud *et al.*, 1991). Éstas últimas utilizan los carbohidratos simples

antes que el almidón y es común que requieran de un umbral de concentración de azúcares simples para utilizarlo. La disponibilidad de monosacáridos y disacáridos es entonces importante para efectuar o iniciar la fermentación láctica.

El almidón es el carbohidrato más abundante en el maíz. La concentración de azúcares simples es baja (Boyer y Shannon, 1987) y probablemente insuficiente para el desarrollo de las bacterias lácticas. Se postula entonces que el tratamiento del maíz previo a la fermentación es de vital importancia para la producción de azúcares fermentables a partir de los cuales pueda ocurrir una acidificación adecuada.

Los tratamientos que tradicionalmente se dan al maíz pueden clasificarse en 4 tipos:

- Remojo de los granos de maíz o del maíz crudo molido. Debido a que no se da ningún tratamiento que pudiera inactivar las enzimas endógenas, como las amilasas, éstas podrían actuar durante el remojo, liberando azúcares fácilmente fermentables.
- La adición de sustancias que aportan enzimas amilolíticas exógenas ( $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa).
- La germinación de los granos de maíz, durante la cual existen y se producen enzimas amilolíticas.
- La nixtamalización o tratamiento térmico alcalino, que es exclusivo de Mesoamérica. A diferencia de los tratamientos anteriores, durante la cocción y los lavados de los granos se pierden azúcares fermentables; de hecho se ha demostrado que el nixtamal no cuenta con una cantidad suficiente de azúcares simples (Santillana, 1995; Wachter, 1995), pero es posible que durante la nixtamalización se degrade el almidón produciendo compuestos de hidrólisis de peso molecular más bajo al mismo (Jackson *et al.*, 1988). También se ha reportado que las bacterias lácticas pueden utilizar oligosacáridos (Olympia, 1992; Olympia *et al.*, 1992), por lo que se sugiere que pudieran ser usados como sustratos para la acidificación.

A la fecha, no se ha demostrado la importancia de estos pretratamientos del maíz para su acidificación durante la fermentación, por lo tanto, en base a lo expuesto anteriormente, se desarrolló el siguiente tema de tesis.

## **ANTECEDENTES**

### **EL MAÍZ**

El maíz, *Zea mays L.* es el segundo cereal que se cosecha en mayor abundancia en el mundo. Crece en cada continente excepto en la Antártida: Norteamérica produce arriba del 50% de la cosecha mundial. Otros productores son China (14%), los Balcanes (8%), oeste de Europa (5%), sur de Brasil (5%), México, Argentina y Sudáfrica con 2% cada uno (Watson y Ramstad, 1987). La facilidad con la cual el maíz puede ser secado, almacenado y transportado ha hecho que sea la mayor fuente de energía para la alimentación animal y es además una materia prima estable para la producción de almidón (es la fuente más económica de almidón) y productos industriales basados en él, como son los jarabes de glucosa. El maíz es también una fuente primaria de alimento en muchas áreas del mundo, incluyendo Sudamérica, América Central y África, donde es convertido directamente en alimento, vía proceso alcalino, hervido, cocido o fermentado.

### **ESTRUCTURA DEL GRANO**

El grano de maíz posee 3 estructuras importantes que se muestran en la Figura 1: el germen o embrión, que constituye del 8 al 10% del grano en peso seco y está compuesto por el eje embrionario, el escutelo y un cotiledón; el endospermo, que tiene una proporción del 82% del grano en peso seco, constituye la reserva nutritiva para el desarrollo y crecimiento del embrión, tiene un contenido de almidón de aproximadamente 73% (Kent-Jones y Amos, 1967;

Inglett, 1970) y el pericarpio que constituye un 6 al 9% del peso seco del grano, es de gran importancia por su composición y permeabilidad y de ella depende la interacción con el medio para el desarrollo de la semilla (Gómez, 1997). El eje embrionario se compone de la radícula, raíz rudimentaria de un hipocotilo, al que se encuentra unido un cotiledón. Contiene todas las enzimas esenciales, nutrientes y material genético para producir una nueva planta de maíz. El escutelo forma cerca del 90% del germen y tiene nutrientes que son movilizados durante la germinación. En la aleurona, que forma parte del pericarpio, tejido de alta actividad metabólica y respiratoria, se sintetizan una gran cantidad de enzimas útiles para la germinación del grano.

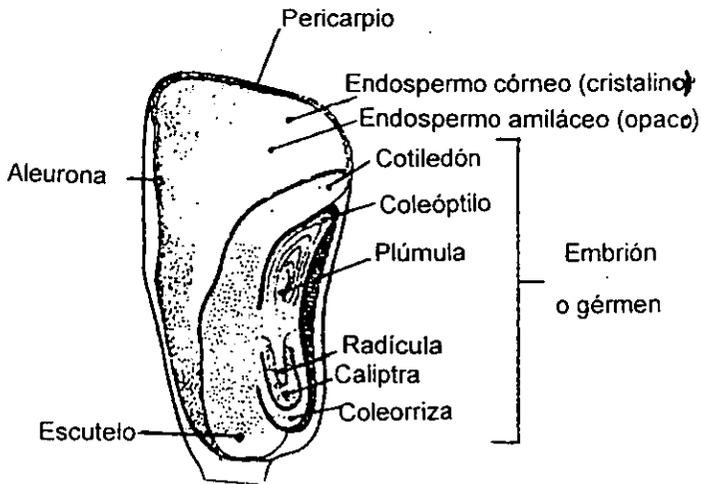


Fig. 1. Corte longitudinal de un grano de maíz.

## COMPOSICIÓN DEL GRANO

El maíz es una planta que pertenece a las gramíneas y sus granos contienen 10.3% de proteínas, 4.5% de grasa, 83.8% de carbohidratos totales, 2.3% de fibra cruda y 1.4% de cenizas; es deficiente en lisina y triptofano; en estado natural sus proteínas son las menos nutritivas de los cereales (Baduí, 1993). De hecho la deficiencia de triptofano, el cual nuestro cuerpo puede convertir a ácido nicotínico, produce la enfermedad llamada pelagra, que prevalece en países con un alto consumo de maíz (Fox y Cameron, 1982).

## EL ALMIDÓN DE MAÍZ

El almidón es el carbohidrato más abundante del grano de maíz. Este se encuentra encerrado por una matriz proteica en forma de gránulos.

En el reino vegetal, los gránulos de almidón ejercen una presión osmótica muy baja, con la que la planta almacena grandes cantidades de glucosa en forma de almidón de una manera muy accesible sin romper el balance interior de agua. La estructura rígida de los gránulos está integrada por capas concéntricas de amilosa y de amilopectina distribuidas radialmente. Estos cuerpos son birrefringentes, es decir, tienen 2 índices de refracción, por lo cual cuando se irradian con luz polarizada desarrollan la típica "cruz de malta". Esto se debe a que dentro del gránulo se localizan zonas cristalinas de moléculas de amilosa ordenadas paralelamente a través de puentes de hidrógeno, así como zonas amorfas causadas principalmente por la amilopectina, que no tienen posibilidad de asociarse entre sí o con la amilosa. Por esta razón, los gránulos que contienen

una proporción grande de la fracción ramificada no presentan birrefringencia; esta característica, al igual que su espectro de rayos X, se pierde cuando los gránulos alcanzan la gelatinización. Este fenómeno ocurre si una suspensión de almidón en agua se calienta, provocando que el agua se difunda a través de las paredes de los gránulos y cause su hinchamiento. Este proceso inicia a una temperatura de alrededor de los 60°C; cerca de los 85°C el volumen de los gránulos se incrementa alrededor de 5 veces y la solución de almidón se vuelve viscosa. Este proceso se llama gelatinización (Baduí, 1993).

Los gránulos de almidón tienen estructuras microscópicas únicas y la fuente de un almidón puede ser determinada por un observador entrenado. La forma y el tamaño de los gránulos de almidón difieren de acuerdo a la fuente botánica y a las condiciones ambientales donde el cereal haya crecido. En la Figura 2 se presenta la apariencia microscópica de los granos de almidón de varios cereales (Pearson, 1976).

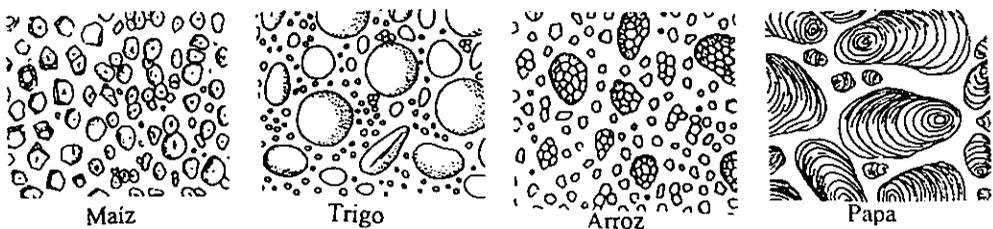
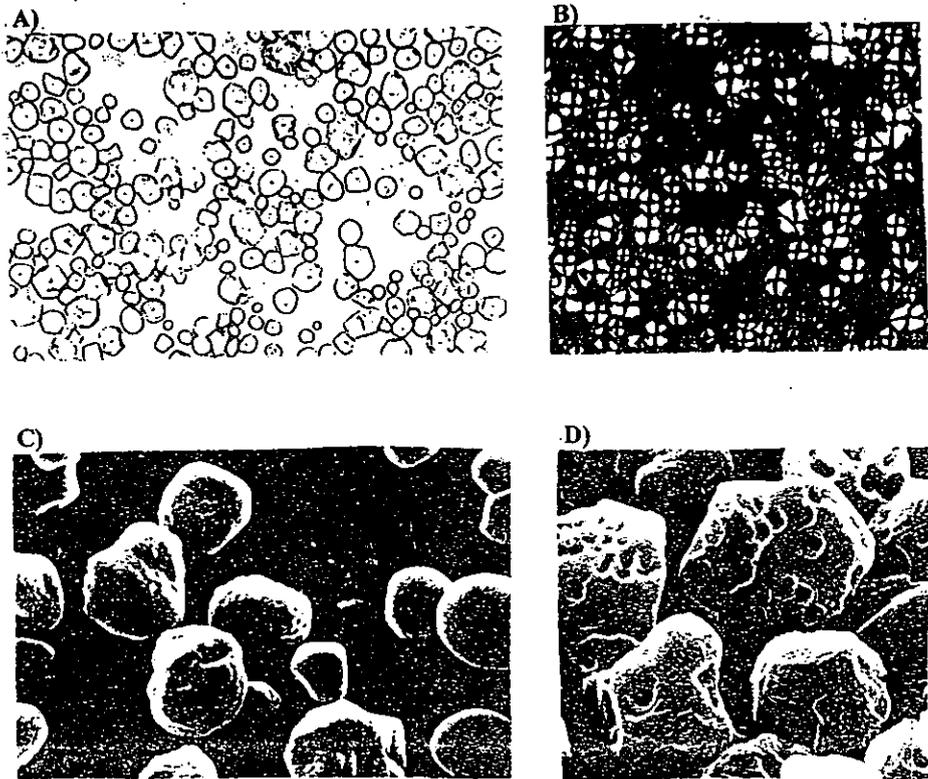


Fig. 2. Apariencia microscópica de gránulos de almidón de varios cereales.

Los gránulos de almidón de maíz están constituidos por 26 al 28% de amilosa y 72 al 74% de amilopectina, aunque hay variedades vitreas que llegan a tener desde un 75 hasta cerca del 100% de amilopectina. Típicamente el almidón de maíz tiene gránulos angulares (polihédricos, Fig. 2), con un diámetro promedio de 35 $\mu$ m. En la Figura 3 se muestran los gránulos de almidón de maíz observados con diferentes aumentos.



**Fig. 3.** Gránulos de almidón de maíz observados con un aumento de 350x (A); con luz polarizada mostrando la "cruz de malta" con un aumento de 700x (B); vistos con un aumento de 1500x (C); así como un almidón de maíz expuesto al ataque de una amilasa (D) (Whistler *et al.*, 1984).

## CARBOHIDRATOS DEL MAÍZ

Los principales constituyentes químicos del grano de maíz son los carbohidratos, las proteínas y los lípidos. Están presentes también cantidades mucho menores de fibra, minerales y diversas sustancias orgánicas, incluyendo vitaminas.

El carbohidrato más abundante del grano es el almidón, constituyendo 72% de su peso seco. La mayoría del almidón se localiza en el endospermo, pero se encuentran niveles significativos en las otras fracciones del grano. Los azúcares simples se encuentran distribuidos en todo el grano, pero la mayor cantidad se encuentra en el embrión. Los azúcares totales del grano de maíz varían entre 1 y 3%. Los monosacáridos del endospermo como la fructosa y la glucosa se encuentran en proporciones semejantes. Se han reportado concentraciones de 1.8 mg de glucosa y 1.6 mg de fructosa en los granos. Otros azúcares (xilosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, manosa) se encuentran en forma de nucleótido-azúcar. Estos son continuamente usados como sustrato para la biosíntesis de polímeros, encontrándose sólo bajos niveles de ellos en el grano. La sacarosa es el disacárido más importante del grano de maíz, donde tres cuartas partes de ella se encuentran en el embrión y la cuarta parte restante en el endospermo; sus concentraciones llegan a ser del 4 al 8% del peso seco del grano. El grano también contiene bajos niveles de maltosa (0.4% del peso seco del grano); sin embargo en algunas variedades dulces se han encontrado niveles tan altos como 1%. Las concentraciones de trisacáridos, como la rafinosa, y oligosacáridos

mayores son muy bajas (Inglett, 1970). La presencia de maltotriosa y maltooligosacáridos sólo ha sido encontrada en una variedad (Watson y Ramstad, 1987).

El fitato, forma fosforilada del myo-inositol, era el único azúcar-alcohol reportado en los granos de maíz; sin embargo estudios más recientes muestran la presencia de sorbitol. El fitato se deposita en los cuerpos proteicos de la aleurona (10%) y del escutelo (90%) del maíz. En granos maduros, el fitato puede constituir el 0.9% del peso seco del grano.

Los granos contienen del 2.1 al 2.3% de fibra cruda. El pericarpio tiene una proporción del 41 al 46% de hemicelulosas y por medio de una extracción alcalina de ésta se han obtenido productos muy ramificados con una composición de 54% de xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucurónico (Inglett, 1970). Los azúcares que contiene el maíz se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Principales azúcares constituyentes del grano de maíz, en peso seco (Boyer y Shannon, 1987).

<b>Monosacáridos</b>	glucosa y fructosa (1-3%).
<b>Disacáridos y trisacáridos</b>	sacarosa (4-8%), maltosa (0.4%), rafinosa, maltotriosa.
<b>Azúcar-alcohol</b>	sorbitol, myo-inositol, fitato (0.9%).
<b>Polisacáridos</b>	almidón (61-78%), hemicelulosa (6.7%), celulosa (3%) y lignina (0.2%).

## GERMINACIÓN

Se denomina colectivamente como germinación a un proceso complejo que ocurre desde el momento en que el embrión del grano reinicia su crecimiento hasta que la plántula se forma y emerge del suelo (Gómez, 1997).

La germinación comienza con la absorción de agua del grano, llamada imbibición, y termina con el inicio de la elongación del eje embrionario, que usualmente constituye la radícula (Bewley y Black, 1994). Se ha estudiado en otros cereales, pero en el caso del maíz existe poca información. Es un proceso exotérmico, promovido por la imbibición y por ciertas condiciones ambientales, como luz, humedad, temperatura y presencia de oxígeno. Se sabe que estos factores activan en primera instancia a las células del meristemo (tejido nuevo) del maíz y a las células de la coleoriza (Gómez, 1997).

El metabolismo del grano es anfibólico, es decir que involucra catabolismo de reservas y anabolismo de nuevos compuestos para la síntesis de nuevas células y estructuras. El proceso de germinación es el resultado de la imbibición del grano, la reactivación de organelos y macromoléculas preexistentes, como ARN, ribosomas, mitocondrias y enzimas y subsecuentes procesos que tratan de restablecer el metabolismo de la planta, con el fin de lograr el desarrollo y crecimiento de la misma.

Los eventos tempranos en la germinación son: la hidratación de la pared celular y de los coloides citoplasmáticos, que depende del grado de humedad y de la dureza del pericarpio; la síntesis de ATP inmediatamente después de la

imbibición, como metabolito necesario para proporcionar energía y para la síntesis de ácidos nucleicos; la síntesis de ARN a la par de la síntesis de ATP durante los primeros 40 min después de la imbibición. Eventos subsecuentes son la expansión celular, la replicación del ADN y la movilización de reservas (Osborne, 1983).

Un fenómeno previo a la germinación, que se activa por medio de algo a la fecha irreconocible (Osborne, 1983), provoca que el grano se seque, llegando su contenido de humedad a ser tan bajo como 10%. A pesar de este cambio tan drástico en el transcurso de pocos días, todas las células del embrión y de la aleurona permanecen vivas. Debido a este cambio, se incrementan en el grano las concentraciones de ciertos azúcares y oligosacáridos, como son la sacarosa, la rafinosa y la estaquiosa, que llegan a ser relativamente abundantes, con el fin de proteger sus estructuras. El embrión contiene azúcares de bajo peso molecular que probablemente usa el grano en las primeras horas de la germinación, mientras se obtienen los productos de hidrólisis del almidón a partir del endospermo. Las concentraciones de sacarosa y rafinosa declinan hasta niveles imperceptibles durante los primeros 2 días desde el comienzo de la imbibición. Posteriormente ocurre un reabastecimiento de carbohidratos, como la sacarosa del endospermo, a partir del tercer día (Bewley y Black, 1994).

El primer cambio en el endospermo es la digestión de las paredes celulares de la membrana intermedia del escutelo, de la cual son responsables las  $\beta$ -glucanasas, las cuales son capaces de romper glucanos de las hemicelulosas, es

decir, uniones  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ . Los gránulos de almidón del endospermo se degradan a glucosa por la acción de 4 enzimas:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, enzima desramificante y  $\alpha$ -glucosidasa. La producción de  $\alpha$ -amilasa inicia en la región del escutelo-aleurona (Kigel y Galili, 1995). La  $\beta$ -amilasa está presente en el endospermo de los granos donde se asocia a los gránulos de almidón (Kigel y Galili, 1995). Se piensa que esta enzima se activa cuando empieza la hidrólisis por la  $\alpha$ -amilasa y por ataque de proteinasas secretadas por la aleurona y/o escutelo, ya que esta enzima está unida a las proteínas por enlaces disulfuro.

La amilosa puede ser degradada por las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, pero la digestión de la amilopectina cesa con la producción de dextrinas límite. Se conoce poco acerca del lugar y el modo de producción de las enzimas desramificantes. Después de que se ha producido la hidrólisis del almidón, los productos de su degradación como es principalmente la glucosa, se movilizan hacia el escutelo, donde existe una síntesis de sacarosa, por medio de la enzima sacarosa-fosfato sintetasa (Cantliffe *et al.*, 1986), que se transporta al eje embrionario, la cual dará origen a la estructura de la nueva planta.

### **LAS AMILASAS**

Se llaman amilasas a las enzimas que son capaces de catalizar la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -D-(1,4) y son ampliamente producidas por plantas, bacterias y animales.

Las amilasas han sido clasificadas bajo diferentes criterios: (a) la configuración del carbono anomérico de sus productos; (b) la fuente biológica; (c)

el tipo de ataque al sustrato, endo o exo; (d) si producen una caída rápida de la viscosidad del sustrato (licuante) o una caída lenta (sacarificante); (e) el tipo de producto formado; y (f) la naturaleza proteica de su estructura. La más común de las clasificaciones es la designación de  $\alpha$  y  $\beta$ , la cual está basada en la configuración anomérica de sus productos (Whistler *et al.*, 1984).

El sustrato de las amilasas es el almidón. Este es una mezcla de dos polímeros de glucosa llamados amilosa y amilopectina. Estos polímeros están inicialmente rodeados dentro de un gránulo semicristalino sintetizado por los organelos de las plantas. La amilosa (Fig. 4) está constituida por largas cadenas lineales con 200-2500 unidades, y pesos moleculares hasta de un millón de daltons unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) glucosídicos. En cambio, la amilopectina (Fig. 5) tiene un peso molecular muy alto, ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltons, las cuales se encuentran unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) glucosídicos.

Además de la amilosa y la amilopectina, el almidón contiene pequeñas cantidades de material de otro origen, tales como fosfatos y grasas. La cantidad y la composición de este material extraño depende de la fuente de almidón de que se trate (Fox y Cameron, 1982).

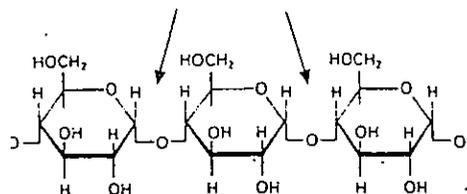


Fig. 4. Porción de una molécula de amilosa mostrando las unidades de  $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4).

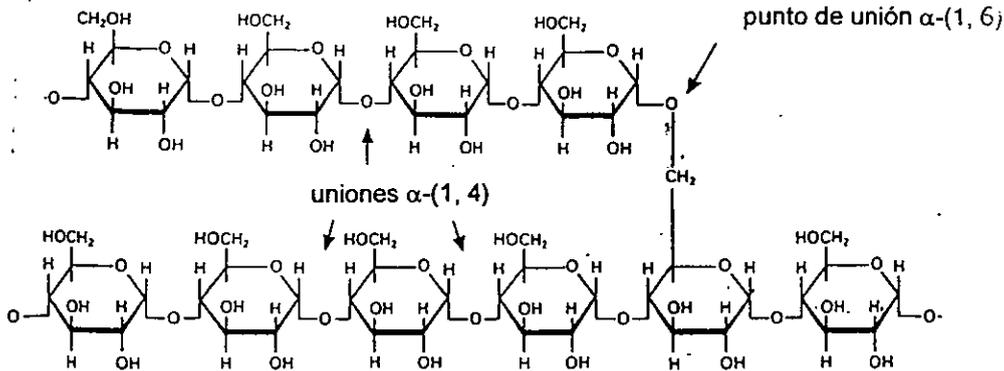


Fig. 5. Porción de una molécula de amilopectina.

Las principales enzimas que rompen los enlaces del almidón son la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa, las cuales rompen las uniones  $\alpha$ -1,4 presentes en la amilosa y en las partes no ramificadas de la amilopectina. Ninguna de las dos enzimas pueden romper los enlaces  $\alpha$ -1,6.

El almidón granular no es susceptible a la hidrólisis por amilasas, pero la harina normalmente contiene una proporción (usualmente de 9-10%) de gránulos de almidón que han sido mecánicamente dañados durante la molienda y provee de "almidón disponible" para la actividad de las amilasas.

### $\alpha$ -AMILASA

La  $\alpha$ -amilasa es una endohidrolasa que actúa al azar en los enlaces internos  $\alpha$ -(1,4) de la amilosa y de la amilopectina, con lo cual se producen dextrinas. Se le da el nombre de enzima licuante debido a que su presencia provoca la rápida reducción de la viscosidad de las soluciones de almidón. Las  $\alpha$ -amilasas también producen varios tipos de oligosacáridos, característicos de cada

una de ellas. Las  $\alpha$ -amilasas son probablemente las más ampliamente distribuidas, ya que son producidas por diferentes tipos de bacterias, hongos, animales y algunas plantas. La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas tienen pesos moleculares alrededor de 50,000 daltons. Todas las  $\alpha$ -amilasas investigadas son dependientes de calcio y su temperatura óptima es de 65-67°C. Los iones calcio aparentemente son quelados por varios grupos de la enzima y esto contribuye a la estabilidad de la estructura terciaria de las mismas. El calcio les imparte resistencia contra los efectos del pH, temperatura y proteólisis (Whistler *et al.*, 1984).

### **$\beta$ -AMILASA**

La  $\beta$ -amilasa está presente en los cereales. La acción de la  $\beta$ -amilasa produce  $\beta$ -maltosa por hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,4) a partir de los extremos no reductores de la amilosa y de la amilopectina, así como la producción de dextrinas de alto peso molecular. Estas dextrinas se forman cuando la  $\beta$ -amilasa llega a un punto ramificado en la amilopectina. De hecho, sólo el 55% de la amilopectina es convertida a  $\beta$ -maltosa (Whistler *et al.*, 1984). Esta actividad la clasifica consecuentemente como una exoenzima. Ninguna de las dos enzimas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) pueden romper enlaces  $\alpha$ -(1,6). La mayoría de las  $\beta$ -amilasas tienen su origen en las plantas. Su temperatura óptima es de 50-60°C.

### **OTRAS AMILASAS**

Otra exo-enzima es la glucoamilasa, la cual produce  $\beta$ -D-glucosa, cuando actúa en los extremos no reductores de las cadenas de almidón. Estas enzimas

difieren de las  $\beta$ -amilasas en que no producen dextrinas límite y catalizan la hidrólisis de ambos enlaces, los  $\alpha$ -D-(1,4) y los  $\alpha$ -D-(1,6). Además de las amilasas, existen otras llamadas isoamilasas o enzimas desramificantes que hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -D-(1,6) de la amilopectina. La enzima R fue la primera en reconocerse dentro de las de este tipo. Otra es la pululanasa, la cual es elaborada por *Aerobacter aerogenes*. Las isoamilasas también han sido obtenidas de levaduras y de bacterias como *Pseudomonas* (Whistler *et al.*, 1984).

### NIXTAMALIZACIÓN

El maíz representa en muchos países de Latinoamérica el principal alimento para gran parte de la población, sobre todo la de escasos recursos económicos. Se consume en formas muy variadas, tales como tortillas, tamales, atole, pinole, etc.

En Mesoamérica el maíz se somete a un proceso térmico alcalino conocido como nixtamalización. Este consiste de los siguientes pasos: primero el maíz se hierve en agua en una proporción maíz:agua de 1:3 (peso:volumen) a la cual se le añade de 1 a 3% de cal, con lo cual se alcanza un pH que varía de 11 a 13. El tiempo de cocción requerido depende de las variedades del maíz, de la composición y espesor del pericarpio, de la temperatura y de la concentración de la cal en el agua. Después de esta cocción, se deja reposar de 10 a 14 horas (toda la noche), alcanzando la temperatura ambiente. El agua de cocción, llamada nexayote, se elimina. El maíz ya lavado (nixtamal) se muele en un molino de piedras en el que, por la fricción, se genera una gran cantidad de energía que

incrementa considerablemente la temperatura de la masa que se obtiene. Finalmente esta masa sirve para preparar un gran número de alimentos (Badui, 1993; Watson y Ramstad, 1987; Trejo- González *et al.*, 1982).

Durante las distintas etapas del proceso de nixtamalización, y debido a los múltiples factores que intervienen en ella, pueden ocurrir una gran variedad de reacciones físicas y químicas. Ya se han estudiado diversos aspectos, como es la influencia de los tiempos, la concentración de álcali, etc., en la modificación de los hidratos de carbono, en las proteínas y en algunos otros componentes.

Se conoce que algunos de los cambios que trae consigo la nixtamalización son la gelatinización y la destrucción parcial de los gránulos de almidón, así como el hinchamiento de las proteínas en el endospermo córneo del grano (Gómez *et al.*, 1989). La hidrólisis de la hemicelulosa, que facilita la remoción del pericarpio, es el cambio estructural más importante (Paredes-López y Saharópulos, 1982) y es promovido por la presencia de la cal y el pH que se alcanza (Trejo-González *et al.*, 1982); el debilitamiento y solubilización de las paredes celulares del endospermo y la modificación de la apariencia física de los cuerpos proteicos del mismo (Gómez *et al.*, 1989), así como la destrucción de algunos aminoácidos y vitaminas. Estos cambios estructurales y químicos del grano durante el proceso afecta sus propiedades funcionales como son la textura, el color, el sabor y la vida de anaquel del producto final.

Se ha reportado que la nixtamalización del maíz mejora su valor nutritivo, ya que incrementa la disponibilidad de la lisina de la parte proteica (Trejo-

González *et al.*, 1982). También se ha visto que después del tratamiento térmico-alcalino, la aleurona permanece pegada al endospermo, la cual mantiene encerrados a los gránulos de almidón y contribuye a la reducción de pérdidas proteicas (Paredes-López y Saharópulos, 1982), lo cual tiene repercusión en el valor nutritivo del grano nixtamalizado.

Por otra parte, con la eliminación del nexayote, donde se solubilizan minerales, grasas, azúcares, vitaminas y algunas proteínas, como las albúminas y las globulinas, las pérdidas de constituyentes durante el paso del maíz a nixtamal varían de 5 a 14%. Se ha reportado una pérdida total de azúcares de 14.5 g/l en estas aguas (Bressani *et al.*, 1958).

Se ha visto que la magnitud y composición de las pérdidas durante la nixtamalización depende de las características del grano y de las condiciones del proceso. Estas pérdidas se pueden incrementar si se utilizan granos muy suaves o dañados (Pflugfelder *et al.*, 1958).

### **ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAÍZ**

En forma general, los alimentos fermentados son aquéllos en cuyo proceso de manufactura intervienen microorganismos. La integración de métodos fermentativos en la conservación de alimentos ha tenido como base ciertas ventajas: la reducción en el tiempo de cocción, el aumento en la digestibilidad del sustrato, el incremento en el valor nutricional, la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y sus toxinas, o la eliminación de sabores y texturas desagradables en los alimentos (Hesseltine y Wang, 1979).

Dentro de la gran variedad de procedimientos culinarios del maíz, destaca la fermentación. Existe una variedad de alimentos fermentados preparados con base en este cereal, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 2. Estos son considerados alimentos fermentados tradicionales, ya que su producción es regional, formando parte importante de la dieta de muchos grupos étnicos. Sus métodos de producción son sencillos, económicos, no requieren equipo complicado, utilizan materias primas disponibles y de bajo costo. Es importante mencionar que mediante la fermentación se producen sabores, aromas y texturas agradables que proporcionan variedad a la dieta a partir del mismo maíz, lo conservan y en ocasiones mejora su valor nutritivo, se producen vitaminas, haciendo más disponibles algunos nutrimentos, aumentando la concentración de proteína y mejorando su calidad (Cravioto *et al.*, 1955).

### **ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAÍZ DE OTRAS PARTES DEL MUNDO**

A partir de Mesoamérica, el maíz se extendió a casi todo el continente Americano y después de la conquista los europeos lo llevaron a sus países de origen y a otros territorios colonizados por ellos. Así llegó a África, Europa y Asia, adquiriendo especial importancia en Italia, Los Balcanes, Filipinas, China, Indochina y en la India (Museo Nacional de Culturas Populares, 1987). En algunos de estos países, especialmente en el continente africano, se desarrollaron alimentos fermentados de maíz, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 3. Existen entre ellos algunos, como la cerveza kaffir y el ogi, que han sido incluso industrializados (Steinkraus, 1989).

**Tabla 2.** Algunos alimentos fermentados de maíz mexicanos.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	TRATAMIENTO DEL MAÍZ PREVIO A LA FERMENTACIÓN	ESTADOS DONDE SE CONSUME
Atole agrio (a,d)	Bebida no embriagante preparada con maíz negro hecho masa y fermentado durante 4 ó 5 días.	Se muele el maíz y se remoja con agua.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Pozol (a, d)	Bebida ácida no embriagante, preparada diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado.	Nixtamalización y molienda de los granos.	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Quintana Roo.
Tesgüino (a)	Bebida semejante a la cerveza, preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con catalizadores que son fragmentos de plantas existentes en la región.	Germinación de los granos.	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco.
Tamal agrio (b, d)	Tamales elaborados con masa fermentada. El <i>xokotamal</i> , que contiene únicamente masa y el <i>etixtamal</i> , que contiene frijol negro, se envuelven en hojas de maíz.	Nixtamalización.	Puebla: Cuetzalan.
Tortilla agria (c,d)	Se cuece el maíz con cal y se deja toda la noche sobre la candela. Ya frío se lava y se muele. La masa se reposa de medio a un día y con la masa aceda se hacen las tortillas.	Nixtamalización.	Quintana Roo, Yucatán.

(a) Cruz Ulloa y Ulloa, 1973; (b) Valderrama y Ramírez, 1993; (c) Nieto y Vázquez, 1993; (d) Escamilla *et al.*, 1991.

**Tabla 3.** Alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo (Steinkraus, 1996)

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	TRATAMIENTO DEL MAÍZ PREVIO A LA FERMENTACIÓN	PAÍS DONDE SE CONSUME
Chicha	Bebida alcohólica de maíz, clara, efervescente, amarillenta.	Adición de saliva o germinación del maíz.	Ecuador, Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Argentina.
Ogi	Papilla de sabor ácido, parecido al del yoghurt.	Remojo de los granos de maíz.	Nigeria
Uji	Sopa cremosa preparada a partir de una suspensión de maíz fermentado antes o después de la cocción.	Preparación de una pasta mezclando el cereal crudo molido con agua.	Kenya
Togwa	Bebida ácida para adultos y niños.	Preparación de una pasta mezclando el cereal crudo molido con agua, se hierve y se añade harina de granos germinados.	Tanzania
Mahewu	Bebida ácida no alcohólica de maíz.	Preparación de una suspensión de maíz molido con agua, a la que se le agrega harina o pasta de trigo.	Sudáfrica
Kenkey	Masa agria de maíz que se consume cocida con caldos de carne o pescado	Remojo de los granos de maíz en agua.	Kenya
Cerveza Kaffir	Bebida alcohólica, efervescente, con sabor ácido parecido al del yoghurt.	Remojo y germinación de una parte de los granos de maíz, la otra parte se muele, se mezcla con agua y se cuece.	Sudáfrica
Pito	Bebida alcohólica de color ligeramente café, ligeramente amarga, agridulce, con sabor frutal.	Remojo y germinación	Nigeria
Busaa	Bebida alcohólica y ácida de maíz y mijo, de consistencia pastosa y color café claro.	Molienda del grano de maíz y mezclado con agua para formar una masa. Remojo y germinación del mijo.	Kenya
Munkoyo	Bebida ácida, ligeramente alcohólica.	Se prepara con el maíz una pasta y se cuece. Se le agrega una extracto de la raíz de munkoyo.	Zambia

## BACTERIAS LÁCTICAS

En la mayoría de los alimentos mencionados en las Tablas 2 y 3 ocurre una fermentación láctica, resultado de la acción de bacterias lácticas. Estas son un grupo heterogéneo de microorganismos que incluye varios géneros (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Atopobium* y *Bifidobacterium*). El ácido láctico, principal producto final de la fermentación de carbohidratos, ha caracterizado a este grupo de bacterias. En general se aceptan 2 tipos de bacterias lácticas: homofermentativas y heterofermentativas, con base en los productos finales de fermentación. Las homofermentativas producen ácido láctico principalmente y las heterofermentativas producen una mezcla de ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>.

Existe otra clasificación, la cual se basa en la presencia o ausencia de ciertas enzimas: a) homofermentativas obligadas: aquellas que tienen fructosa-bifosfato aldolasa pero no glucosa-6-P deshidrogenasa; b) heterofermentativas obligadas: tienen la deshidrogenasa pero no fructosa-bifosfato aldolasa; c) homofermentativas facultativas: tienen las 2 enzimas y son capaces de utilizar cualquiera de las dos rutas. Los géneros *Pediococcus* y *Streptococcus* son cepas homofermentativas, mientras que las cepas de *Leuconostoc* son heterofermentativas y las de *Lactobacillus* pueden llegar a ser homo o heterofermentativas (Wood y Holzapfel, 1995).

La actividad fundamental de las bacterias lácticas en las fermentaciones del maíz es la acidificación a partir de los azúcares simples (Tabla 1) que lo constituyen.

Se puede observar en las Tablas 2 y 3, cuatro tipos de tratamiento del maíz previo a su fermentación: remojo (ogi, kenkey, cerveza kaffir, pito), adición de sustancias con enzimas amilolíticas (mahewu, togwa, munkoyo), germinación (tesgüino, bussá, chicha) y nixtamalización (pozol, tortilla agria). El efecto de estos pretratamientos en la acidificación del maíz es el motivo del presente estudio.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General:

Determinar el efecto de tratamiento previo a la fermentación de los granos en la acidificación por bacterias lácticas de alimentos fermentados de maíz.

### Objetivos Particulares:

1.- Conocer el tipo y la concentración de hidratos de carbono que se producen en el maíz con cada uno de los tratamientos a los que comúnmente se somete antes de su fermentación (remojo, adición de una fuente externa de amilasas, germinación y nixtamalización).

2.- Comparar el crecimiento de una bacteria láctica y el grado de acidificación producido por la misma en sustratos de maíz con cada uno de los tratamientos mencionados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

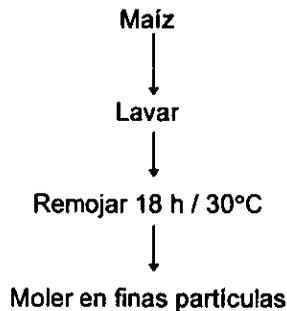
### **1. Fermentación de maíz con diferentes tipos de tratamiento.**

#### **1.1. Preparación de sustratos.**

##### **1.1.1. Tratamientos del maíz.**

###### **1.1.1.1. Maíz con remojo (kenkey).**

Se pesó un kilogramo de granos de maíz, se lavó con agua corriente y se puso a remojar en una tina con agua durante 18 h a 30°C. Se escurrió el agua y se molieron los granos en finas partículas en un molino para cereales (San Bar, México) (Figura 6).

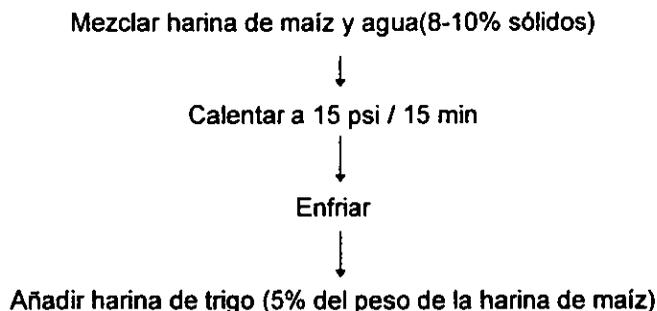


**Fig.6. Preparación del maíz con remojo.**

###### **1.1.1.2. Maíz con la adición de harina de trigo como fuente de amilasas, (mahewu).**

Se molieron los granos de maíz en seco en un molino para cereales (San Bar, México) para producir una harina. Se pesaron 100 g de la harina obtenida y se agregó agua hasta formar una mezcla al 10% de sólidos. Esta mezcla se hirvió a 1 Kg/cm<sup>2</sup> por 15 minutos. Se dejó enfriar y se añadió harina de trigo al 5% del

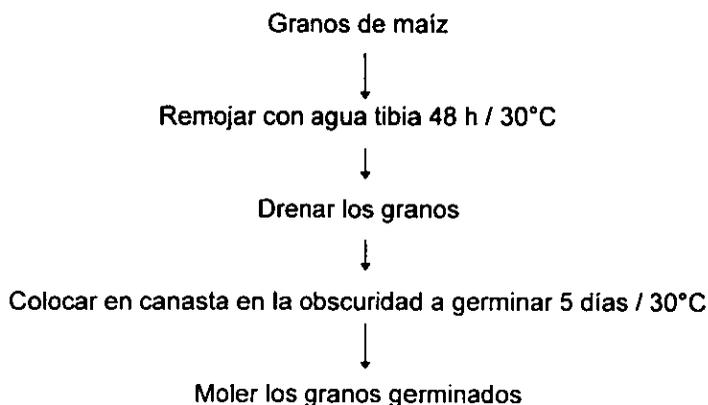
peso de la harina de maíz (Figura 7). Este tratamiento será denominado maíz + amilasas.



**Fig. 7.** Preparación del maíz con la adición de amilasas.

#### **1.1.1.3. Maíz germinado (tesgüino).**

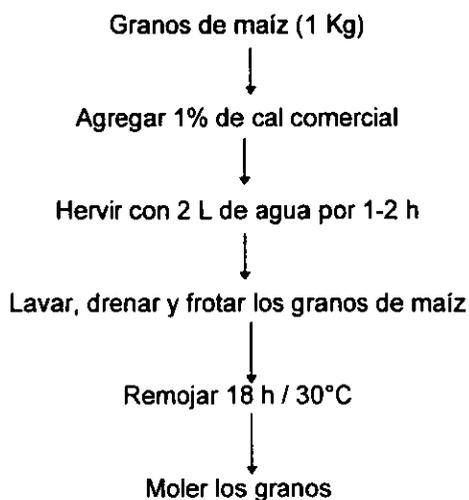
Se pesó un kilogramo de granos de maíz y se remojó en agua durante 48 h a 30°C. Se drenaron los granos y se germinaron durante 5 días a 30°C en una tina en la oscuridad. Se molieron los granos germinados en finas partículas en un molino para cereales (San Bar, México) (Figura 8).



**Fig. 8.** Preparación del maíz germinado.

#### 1.1.1.4. Maíz nixtamalizado (pozol).

Se pesó un kilogramo de granos de maíz y se les agregó 1% (p/p) de cal comercial. Se añadieron dos litros de agua y se hirvieron durante una hora. Los granos se drenaron, lavaron y frotaron para eliminar las cascarillas. Se pusieron a remojar en agua durante 18 h a 30°C. Se drenaron y molieron los granos en finas partículas en un molino para cereales (Figura 9).



**Fig. 9.** Preparación del maíz nixtamalizado

#### 1.1.2. Ajuste de humedad.

Se determinó el porcentaje de humedad de cada uno de los tratamientos por secado a 100°C. En la Tabla 4 se presenta el porcentaje de humedad del maíz después de cada tratamiento y el volumen de agua a añadir a cada uno por cada 250 g de maíz para ajustar la humedad a 80%.

**Tabla 4.** Porcentaje de humedad y volumen de agua añadido a las masas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Porcentaje de Humedad</b>	<b>Agua destilada estéril agregada a 250 g de maíz tratado (ml)</b>
Remojo	38.0	100
Adición de amilasas	79.06	2.3
Germinación	55.8	55.3
Nixtamalización	48.2	74.5

### **1.1.3. Esterilización de los sustratos.**

Una vez preparadas y molidas las muestras, se pesaron porciones de 250 g de maíz obtenido con cada uno de los tratamientos y se colocaron en 4 bolsas de plástico que se sellaron con calor procurando sacar el mayor volumen de aire antes de sellarlas. Se irradiaron en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) con radiación gamma del Cobalto<sup>60</sup> en el Irradiador JS-6500 a una dosis final de 2.5 Mrads (25 KGy).

### **1.2. Determinación de la actividad amilolítica de la harina de trigo utilizada como fuente de amilasas.**

La actividad amilolítica se determinó midiendo la liberación de azúcares reductores de almidón soluble por el método del DNS.

Se realizó una curva patrón de glucosa con concentraciones de 0.2 a 2 g/l. Las lecturas de absorbancia leídas a 540 nm correspondientes a cada concentración se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Curva patrón de glucosa por el método de DNS.

tubo	concentración de glucosa (X) (g/l)	Absorbancia (Y) (ensayo1/ensayo2)
1	0.2	0.089/0.070
2	0.4	0.177/0.168
3	0.6	0.362/0.344
4	0.8	0.413/0.445
5	1.0	0.598/0.605
6	1.2	0.720/0.700
7	1.4	0.802/0.843
8	1.6	0.976/0.976
9	1.8	1.053/1.053
10	2.0	1.120/1.120

De estos datos se calcularon la ordenada al origen y la pendiente. La ecuación de la recta obtenida es la siguiente:

$$Y = 0.604 X - 0.0327$$

El ensayo se llevó a cabo a 30°C (temperatura de fermentación). Para extraer la enzima se pesaron 5g de harina de trigo, se añadieron 7.5 ml de regulador de acetatos pH=5.6. La mezcla se maceró por 5 min en un mortero. La mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 12 min. Se recolectó el sobrenadante (extracto enzimático) y se acondicionó a 30°C. La mezcla de ensayo contenía 2 ml de una solución al 2% de almidón y un mililitro del extracto enzimático. Después de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos de incubación a la temperatura mencionada, se tomaron 100 µl de la mezcla, se vaciaron en tubos eppendorf que contenían 100 µl de la solución de DNS, se agitaron a manera de detener la reacción enzimática, se calentaron a 100°C por 5 min, se enfriaron y la absorbancia fue determinada a 540 nm en el espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5 de Milton Roy). Una unidad

de amilasa libera  $1 \mu\text{g glucosa g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . En base a la ecuación de la curva patrón se calculó la concentración de azúcares reductores (expresados como glucosa) en  $\mu\text{g de glucosa ml}^{-1}$  liberados en cada tiempo. Si se grafica la concentración de azúcares reductores liberados con respecto al tiempo, la pendiente de esta recta nos da las unidades de amilasa presentes en los 5 gramos de harina de trigo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Datos de absorbancia y concentración de glucosa obtenidos para la reacción enzimática con respecto al tiempo.

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración de glucosa ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	0	0
5	0.358	184
10	0.363	187
15	0.372	192
20	0.385	200
25	0.401	210
30	0.418	220

### 1.3. Microorganismo utilizado.

Se seleccionó una bacteria láctica no amilolítica aislada del pozol, que corresponde a *Lactobacillus plantarum* (cepa 42 L) y cuyos resultados del patrón de fermentación de azúcares por medio del sistema API50CH (BioMérieux) se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Patrón de fermentación de azúcares por medio del sistema API50CH (BioMérieux) de *L. plantarum* a las 24 h de incubación a 29°C (Flores, 1996).

Azúcar	Grado de fermentación	Azúcar	Grado de fermentación
esculina	3	glicerol	0
salicina	2	erithritol	0
celobiosa	2	D-arabinosa	0
maltosa	3	L-arabinosa	3
lactosa	0	ribosa	0
melibiosa	0	D-xilosa	0
sacarosa	3	L-xilosa	0
trehalosa	3	adonitol	0
inulina	0	$\beta$ metil-xilosida	0
melezitosa	0	galactosa	0
D-rafinosa	0	D-glucosa	3
almidón	0	D-fructosa	3
glucógeno	0	D-manosa	3
xilitol	0	L-sorbosa	0
$\beta$ gentobiosa	1	ramnosa	0
D- turanosa	3	dulcitol	0
D-lyxosa	0	inositol	0
D-tagatosa	0	manitol	2
D-fucosa	0	sorbitol	0
L-fucosa	0	$\alpha$ metil-D-manósido	0
L-arabitol	0	$\alpha$ metil-D-glucósido	0
D-arabitol	0	Nacetilglucosamina	2
gluconato	1	amigdalina	0
2 ceto gluconato	0	arbutina	2
5 ceto gluconato	0		

Nota: Los números indican el grado de fermentación por la producción de ácidos que se reflejan en las siguientes tonalidades: sin cambio de color como (0), verde hoja como (1), verde claro y verde limón como (2) y amarillo como (3).

#### 1.4. Conservación del microorganismo.

El microorganismo se conservó a corto plazo en viales con 3.5 ml de caldo APT (Apéndice 1) semisólido (0.3% de agar bacteriológico No. 1 Oxoid L11) y una punta de espátula de CaCO<sub>2</sub>. El microorganismo se sembró por picadura y se

incubó a 30°C durante 48 h. Posteriormente se almacenó a 4°C. Para su conservación a largo plazo, se prepararon y esterilizaron tubos de centrifuga con 10 ml de Caldo Nutritivo (apéndice 1) en los cuales se inoculó una asada del microorganismo. Se incubaron a 30°C por 24 h. Se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y el cultivo se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril. Por otro lado, se prepararon viales de plástico con 1 ml de Caldo Nutritivo con glicerol al 15% y 15 a 20 perlas de vidrio perforadas. Se esterilizaron a 121°C por 15 min. Se vació un mililitro del cultivo obtenido en los tubos de centrifuga en estos viales de plástico. Se agitó el cultivo para homogeneizar y procurando que las perlas se impregnaran del microorganismo. Después se extrajo con pipeta estéril la mayor parte del Caldo Nutritivo/glicerol contenido en el vial y se almacenaron en ultracongelación a -70°C.

#### **1.5. Preparación del inóculo.**

Se inoculó la cepa 42 L en un tubo de centrifuga con 10 ml de Caldo APT (Apéndice 1) y se incubó a 30° por 24 h. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril para lavar las células y se centrifugó nuevamente. Se eliminó el sobrenadante, se suspendió la biomasa en 10 ml de agua estéril y se diluyó 10/90 con agua peptonada estéril al 0.1%. Se agregaron 5 ml de esta dilución a cada bolsa de 250 g de masa preparada con cada uno de los métodos.

### **1.6. Inoculación del microorganismo.**

Se cortaron las bolsas por la parte superior con tijeras flameadas con alcohol. Se les agregó la cantidad de agua estéril calculada (Tabla 4) para ajustar la humedad a cada una de las muestras, la cual ya contenía los 5 ml del inóculo.

### **1.7. Sistema de fermentación.**

Se amasó cada una de las muestras dentro de la bolsa y se procedió a repartir 50 g de masa en frascos Gerber esterilizados previamente, con la ayuda de una espátula flameada, compactando la masa para eliminar la mayor cantidad de aire y se taparon con papel aluminio sujeto con una liga. Se incubaron a 30°C y se tomaron muestras a las 0, 5, 11, 24, 48 y 72 horas, sacrificando 3 frascos a cada tiempo de muestreo.

### **1.8. Muestreo.**

Primero se tomaron los 10 g de masa correspondientes al análisis microbiológico y se procedió a realizarlo de acuerdo al punto 1.9.1.1. Después se tomaron los 10 g de masa para hacer la determinación de pH, la cual serviría también para determinar la acidez titulable de la muestra, de acuerdo a los puntos 1.9.2.1. y 1.9.2.2. Se procedió a tomar 5 g de muestra para llevar a cabo la cuantificación de carbohidratos, oligosacáridos y de ácidos de acuerdo a los puntos 1.9.2.3., 1.9.2.4. y 1.9.2.5. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## **1.9. Análisis realizados a todas las muestras de maíz.**

### **1.9.1. Análisis microbiológicos.**

#### **1.9.1.1. Determinación del crecimiento microbiano.**

Se tomaron 10 g de masa del centro del frasco con espátula flameada previamente en alcohol y se depositaron en una bolsa de Stomacher. Se añadieron 90 ml de agua peptonada al 0.1% (peptona bacteriológica Oxoid L37) y se homogeneizaron en Stomacher (Seward 400) a velocidad normal por 30 segundos. Se hicieron diluciones decimales en el mismo diluyente e inocularon para la determinación de cuenta en placa. Se inocularon 0.1 ml de la dilución correspondiente en las cajas Petri con el método de extensión por superficie empleando una varilla de vidrio doblada en L y flameada. Se incubaron a 30°C durante 24 h y se contaron las colonias correspondientes al término de este período.

Se utilizó el Agar MRS (Apéndice 1) para contar bacterias lácticas y el Agar Cuenta en Placa (Apéndice 1) para detectar posibles contaminantes.

### **1.9.2. Análisis fisicoquímicos.**

#### **1.9.2.1. Determinación de pH.**

Se tomaron 10 g de la muestra y se dispersaron en 50 ml de agua destilada. Se determinó el pH en un potenciómetro (Jenway 3020), calibrado con anterioridad con soluciones reguladoras de pH 4 y 7.

### **1.9.2.2. Acidez titulable.**

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

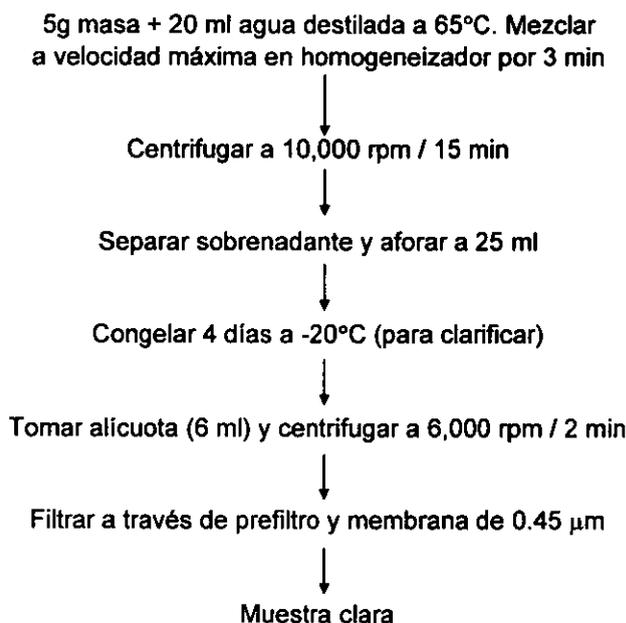
$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{\text{ml gastados} \times N(\text{NaOH}) \times 0.09 \times 100}{\text{g muestra}}$$

### **1.9.2.3. Cuantificación de hidratos de carbono.**

#### **1.9.2.3.1. Procedimiento de extracción y clarificación.**

El proceso de extracción y clarificación de las muestras se realizó en base al método desarrollado por Santillana (1995), que se presenta en la Figura 10 y el cual se explica a continuación. Se tomaron 5 gramos de masa del centro del frasco y se colocaron en tubos de centrifuga. Se adicionaron 20 ml de agua destilada a 65°C. Se mezcló a velocidad máxima en un homogeneizador (Glas-Col Núm.Cat. 099C K44) durante 3 min. Se centrifugaron los tubos en una centrifuga (Beckman J2-21M/E) a 10,000 rpm por 15 min. Se separó el sobrenadante y éste se aforó a 25 ml. Los 25 ml se pusieron en bolsas de plástico, debidamente marcadas y selladas y se almacenaron en congelación a -20°C durante 4 días. Al final de este período se descongelaron las muestras, se homogeneizaron y se

tomó una alícuota de 6 ml, los cuales se centrifugaron en una microcentrífuga (Tomy Kogyo HF-130) a 6,000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se filtró a través de prefiltro (Millipore AP2501000) y membrana de 0.45 $\mu$ m (Millipore HVLP01300) obteniéndose la muestra clara y lista para la cuantificación.



**Fig.10.** Procedimiento de extracción y clarificación.

#### **1.9.2.3.2. Cuantificación enzimática de carbohidratos simples.**

Para determinar la cantidad de hidratos de carbono, se utilizaron dos sistemas enzimáticos comerciales: D-Glucosa/D-Fructosa (Boehringer 139 106) y Maltosa/Sacarosa/D-Glucosa (Boehringer 1 113 950), cuyo principio se explica en el Apéndice 2, utilizando un volumen total de prueba de 1 ml.

#### 1.9.2.4. Cuantificación de oligosacáridos por HPLC.

##### 1.9.2.4.1. Preparación de los estándares de oligosacáridos

Se prepararon disoluciones de estándares de: maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa y maltoheptaosa (M3-M7), usando reactivos de Sigma, de 0.1 a 0.8%, excepto para la maltohexosa (0.1 a 1.0%), con los que se hicieron las curvas de calibración.

A partir de estas áreas se calcularon la ordenada al origen y la pendiente para cada oligosacárido. La ecuación de la recta obtenida en cada caso es la siguiente:

$$M3 \quad Y = 11421111 X + 53368$$

$$M4 \quad Y = 10580078 X + 833899$$

$$M5 \quad Y = 11461566 X - 95735$$

$$M6 \quad Y = 13014034 X + 615445$$

$$M7 \quad Y = 11799429 X - 266075$$

donde y = área de respuesta; x = concentración

Se utilizaron estas ecuaciones para calcular la concentración de oligosacáridos en muestras.

##### 1.9.2.4.2. Preparación y análisis de oligosacáridos de muestras.

Las muestras de cada fermentación se extrajeron y clarificaron según el método señalado en la Figura 10.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos series 250 con bomba isocrática LC 250 y un loop de 20  $\mu$ l, utilizando una columna PL Hi-Plex Ag 1171-6150. Se usó un detector de índice de refracción LC-30 RI con un integrador personal modelo 1020S. Se mantuvo la temperatura de la columna en 85°C, con horno (LC-Oven 101) con una temperatura de 85°C para cada corrida. Todo el equipo utilizado fue de Perkin Elmer.

La fase móvil utilizada fue agua desionizada, la cual se desgasificó utilizando un sonicador (Bransonic Ultrasonic Cleaners modelo 2210). Este eluyente se usó con un flujo de 0.3 ml/min.

Antes de inyectar las muestras, se inyectó una solución estándar con el fin de determinar los tiempos de retención y el buen funcionamiento del equipo. La concentración de los oligosacáridos se reportó como g/100g de masa en base seca.

#### **1.9.2.5. Cuantificación de ácidos por HPLC.**

##### **1.8.2.5.1. Preparación de los estándares de ácidos.**

Se prepararon disoluciones de estándares de lactato de litio y acetato de sodio, usando reactivos de Sigma, de 0.1 a 1.0 % con los que se hicieron las curvas de calibración.

A partir de las áreas obtenidas se calcularon la ordenada al origen y la pendiente para cada ácido. La ecuación de la recta obtenida en cada caso es la siguiente:

$$\text{ácido láctico} \quad Y = 23783541 X + 54542$$

ácido acético  $Y = 11388582 X + 26495$

donde Y = área de respuesta; X = concentración

#### **1.9.2.5.2. Preparación y análisis de ácidos de muestras.**

La muestra se preparó de la misma manera que en el punto 1.9.2.4.2.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos series 250 con una bomba isocrática LC 250 y un loop de 100  $\mu$ l, utilizando una columna Aminex Ion Exclusion HPX87H (Biorad Labs.) de 30 cm. Se usó un detector de índice de refracción LC-30 RI con un integrador personal modelo 1020S. Todo el equipo utilizado fue de Perkin Elmer.

La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 0.01N, que se desgasificó utilizando un sonicador (Branson Ultrasonic Cleaners modelo 2210). Esta fase se usó con un flujo de 0.6 ml/min.

Antes de inyectar las muestras, se inyectó una solución estándar con el fin de verificar los tiempos de retención y el buen funcionamiento del equipo. La concentración de los ácidos se reportó como g/100g de masa en base seca.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Fermentación de maíz con diferentes tipos de tratamiento.**

#### **1.1 Contenido y diferencias de azúcares y oligosacáridos en el maíz después de los tratamientos.**

En la Tabla 8 se muestran los datos de los azúcares encontrados en los sustratos antes y después de su fermentación. Se muestran los contenidos de azúcares en el maíz y en el trigo, de los cuales se partió para someterlos a los diferentes tratamientos. La sacarosa y la maltosa fueron los principales azúcares, con concentraciones menores de glucosa y fructosa. La concentración de glucosa en el maíz fue de 0.16 g/100g y las de fructosa, sacarosa y maltosa 0.08, 1.1 y 1.1 g/100g respectivamente (Tabla 8). Estos datos concuerdan con los de la literatura, donde se reporta que se pueden encontrar concentraciones de 1 al 3% de azúcares simples en el grano de maíz (Inglett, 1970) (la suma de las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa fue 1.34%). Sin embargo también se ha reportado que la sacarosa se puede encontrar en concentraciones de 4 a 8% (Watson y Ramstad, 1987) (Tabla 1). En el caso del trigo, se obtuvieron concentraciones de 0.07, 0.04, 1.3 y 1.5 g/100g de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa respectivamente. El porcentaje de humedad fue de 10.1% para el maíz y de 15% para el trigo.

Se observaron diferencias marcadas en el contenido de azúcares después de los diferentes tratamientos (Tabla 8). El maíz germinado fue el sustrato con mayor cantidad de azúcares. La mayor concentración de azúcares en este sustrato es el resultado de la alta actividad enzimática que sufre el grano durante

la germinación (Gómez, 1997). Durante la germinación, la concentración de glucosa aumentó de 0.16 a 15.8 g, la de fructosa de 0.08 a 4.3 g, la de sacarosa de 1.1 a 29.3 g y la de maltosa de 1.1 a 20.9 g/100g de masa con respecto al grano de maíz sin tratamiento. La bacteria utilizada es capaz de fermentar los azúcares presentes en el maíz (Tabla 7), pero no se observó una disminución en la concentración de estos azúcares como resultado del crecimiento del microorganismo durante la fermentación (Tabla 8). Contrariamente se observó un aumento, ya que la dosis de irradiación aplicada no es suficiente para inactivar enzimas. La fructosa, sin embargo se consumió totalmente, y pudo haber sido aprovechada por el microorganismo para crecer o para la síntesis de sacarosa, por las enzimas producidas durante la germinación.

En el caso del maíz remojado, la concentración de glucosa aumentó 0.16 a 5.9 g, la de fructosa de 0.08 a 0.9g, la de sacarosa de 1.1 a 9.7 g y la de maltosa de 1.1 a 7.4 g/100g de masa con respecto al grano de maíz sin tratamiento (Tabla 8) y además se produjeron maltotriosa y maltotetrosa (Tabla 9). Esto confirma que actuaron enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas endógenas durante el remojo, que constituye el inicio del proceso de germinación del mismo. Como en el caso del maíz germinado, se esperaba que continuara esta actividad enzimática durante la fermentación, pero aún así se observa el consumo parcial de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa por el microorganismo.

En el caso del maíz + amilasas, la concentración de glucosa y maltosa aumentó de 0.16 a 0.4 g y de 1.1 a 11 g/100g de masa respectivamente,

comparando con el grano de maíz sin tratamiento y no se produjeron fructosa ni sacarosa. Al hacer la determinación de la actividad amilolítica de la harina de trigo, se comprobó que ésta si constituía una fuente de amilasas en el medio mixto (maíz + trigo), ya que se obtuvo una actividad de  $7.74 \mu\text{g de glucosa min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de harina, que equivaldrían a 7.74 unidades de amilasa presentes en la misma. La cantidad de azúcares añadida con la harina de trigo fue insignificante (0.004g de glucosa, 0.002g de fructosa, 0.065g de sacarosa y 0.078g maltosa por 100g de maíz). En este caso si fue posible observar el consumo de estos azúcares por el microorganismo (Tabla 8).

No existen muchos datos en la literatura sobre la concentración de azúcares en alimentos fermentados de maíz. En el caso del uji (maíz + fuente de amilasas), se han reportado concentraciones de 0.42 a 0.67% p/p de sacarosa (Steinkraus, 1996), concentración del azúcar que está por debajo de 1.2 % que se obtuvo en este estudio para el maíz + amilasas.

En el caso del maíz nixtamalizado, donde era de esperarse que se encontrara la menor concentración de azúcares debido a los lavados a que se sujetan los granos, se observaron pérdidas de azúcares a diferencia de los otros tratamientos. La concentración de glucosa disminuyó de 0.16 a 0.05 g/100g de masa, la de fructosa de 0.08 a 0.06 g/100g de masa, la de maltosa de 1.1 a 0.9 g/100g de masa y la concentración de sacarosa fue similar, de 1.1 a 1.3 g/100g de masa. El microorganismo consumió casi en su totalidad estos azúcares.

En el caso del maíz remojado, el germinado y el maíz + amilasas aumentó la concentración de azúcares simples con respecto al grano sin tratamiento, en cambio, en el caso de la nixtamalización, el tratamiento térmico alcalino seguramente inactiva las enzimas, por lo que no se produjeron azúcares y además las cantidades iniciales en el grano se perdieron durante el proceso.

**Tabla 8.** Concentraciones de los azúcares encontrados al inicio y al final de las fermentaciones con maíz sometido a diferentes tratamientos.

	g/100g de masa en base seca							
	Glucosa		Fructosa		Sacarosa		Maltosa	
Maíz	0.16		0.08		1.1		1.1	
Tiempo de fermentación	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
Maíz remojado	5.9 ±0.276	5.2 ±1.02	0.9 ±0.07	0	9.7 ±1.406	8.5 ±0.556	7.4 ±0.366	4.9 ±0.38
Maíz + amilasas <sup>1</sup>	0.4 0.027	0	0.08 ±0.05	0	1.2 ±0.117	0.2 ±0.11	11.0 ±0.528	9.3 ±0.337
Maíz germinado	15.8 ±0.64	35.3 ±0.23	4.3 ±0.19	0	29.3 ±1.674	61.4 ±5.876	20.9 ±1.45	38.4 ±5.488
Maíz nixtamalizado	0.05 ±0.03	0.008 ±0.002	0.06 ±0.01	0.007± 0.002	1.3 ±0.105	0	0.9 ±0.076	0.2 ±0.011

(1. Trigo: Glucosa 0.07%; Fructosa 0.04%; Sacarosa 1.3%; Maltosa 1.5%)

Se encontraron oligosacáridos únicamente en las muestras de maíz remojado y de maíz germinado (Tabla 9). En el maíz remojado por acción de sus enzimas endógenas, se produjeron 0.6 y 1.5 g/100g de maltotriosa y maltotetraosa respectivamente. Ambos oligosacáridos desaparecieron del medio durante la fermentación, por lo que el microorganismo los pudo haber consumido, o pudieron haber sido degradados hasta glucosa por enzimas como la  $\alpha$ -glucosidasa (Steup, 1988), lo cual ha sido confirmado en estudios hechos en polisacáridos del

endospermo de maíz dulce, maíz waxy y maíz con alto contenido de amilosa por Pagano y Krisman, 1993. En el maíz germinado se produjeron los dos oligosacáridos (M3 y M4) en concentraciones de 1.6 y 1.5 g/100g de maltotriosa y maltotetrosa a las 72 h. En el maíz + amilasas, posiblemente por el efecto retardado de alguna amilasa se produjeron sólo hasta las 72 horas, 0.4 g/100g de maltotriosa.

En el maíz nixtamalizado no se detectaron oligosacáridos, ya que las amilasas seguramente se inactivan durante la nixtamalización. Se ha reportado la formación de oligosacáridos con tratamiento térmico alcalino de almidón (Jackson *et al.*, 1988), donde disminuye el peso molecular del mismo en presencia de concentraciones tan bajas como 0.005% de CaO, sin embargo en el maíz nixtamalizado no se detectaron.

**Tabla 9.** Concentraciones de los oligosacáridos encontrados al inicio y al final de las fermentaciones con maíz sometido a diferentes tratamientos.

	g/100g de masa en base seca			
	Maltotriosa (M3)		Maltotetrosa (M4)	
	0 h	72 h	0 h	72 h
Tiempo de fermentación				
Maíz remojado	0.6±0.13	0	1.5±0.19	0
Maíz + amilasas	0	0.4±0.06	0	0
Maíz germinado	1.03±0.12	1.6±0.25	1.6±0.02	1.5±0.02
Maíz nixtamalizado	0	0	0	0

## **1.2 Diferencias en el crecimiento microbiano y acidificación de las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos.**

El crecimiento microbiano para las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos de *L. plantarum* incubadas a 30°C se muestran en la Figura 11. En ninguna de estas fermentaciones se encontraron microorganismos contaminantes al sembrar en agar cuenta en placa.

A pesar de que las concentraciones de azúcares en las masas (Tabla 8) al inicio de la fermentación fueron muy diferentes entre sí, el crecimiento de *L. plantarum* fue muy parecido en las primeras 11 horas de fermentación, alcanzando valores de alrededor de  $10^9$  ufc/ml en el caso de las fermentaciones en maíz remojado, maíz + amilasas y maíz nixtamalizado (Figura 11). La fermentación del maíz germinado no mostró este comportamiento, ya que empezó con una cuenta inicial más baja ( $10^6$  ufc/ml) en comparación con las otras (a pesar de haber sido inoculada con la misma suspensión microbiana que las otras), y su cuenta se mantiene alrededor de  $10^6$  ufc/ml hasta las 11 horas. Este retraso en el crecimiento de *L. plantarum* en el sustrato, podría deberse al acostumbramiento del microorganismo a la gran cantidad de azúcares existentes, a diferencia de los otros tratamientos o a la presencia de alguna sustancia producida durante la germinación, que estuviera inhibiendo su crecimiento. A partir de las 11 horas, sin embargo, inició el crecimiento microbiano en la fermentación de maíz germinado para llegar a una cuenta de casi  $10^9$  ufc/ml, que es muy semejante a las de las demás fermentaciones a las 24 h.

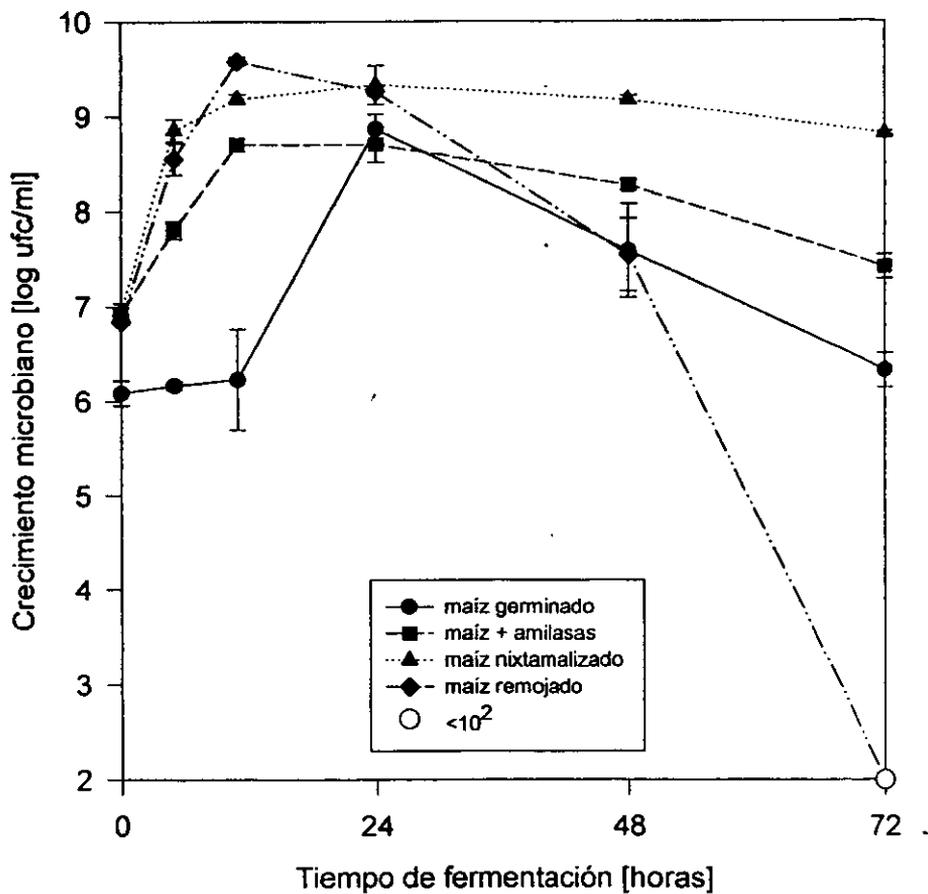


Figura 11. Crecimiento microbiano de *L. plantarum* en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C.

A partir de las 48 horas de fermentación, ocurrió un decremento en las cuentas de *L. plantarum*, en las fermentaciones de maíz remojado, maíz + amilasas y maíz germinado, pero no en la de maíz nixtamalizado (Fig. 11). El crecimiento se detuvo cuando el pH de los sustratos alcanzó un valor cercano a 4.5 (Figura 12). En el caso de la masa nixtamalizada, en la que el valor de pH disminuyó solamente a 5, las cuentas se redujeron ligeramente. Se sabe que las bacterias lácticas crecen hasta que se alcanza un cierto grado de acidificación (presencia de ácidos y pH bajo), resultando en la inhibición de las actividades microbianas (Holzapfel, 1989).

El maíz remojado fue el que mostró la mayor velocidad de acidificación (Figura 12) y con el que *L. plantarum* alcanzó la mayor cuenta (Fig. 11). Después del maíz germinado, el maíz remojado fue el sustrato en el que se produjo la mayor concentración de azúcares simples (Tabla 8) y de oligosacáridos (Tabla 9). Se observó en él también la inhibición más drástica de *L. plantarum*, el cual ya no se detectó a las 72 horas. En el maíz germinado y el maíz remojado se obtuvieron las mayores concentraciones de ácidos (Tabla 10); se obtuvieron concentraciones semejantes de ácido láctico (2.3 y 2.4 g/100g en base seca respectivamente), pero una mayor concentración de ácido acético en el maíz germinado (1.5 g/100g de masa en peso seco) que en el remojado (0.3 g/100g de masa). Esto coincidió con la mayor inhibición de *L. plantarum* obtenida para ambas, comparando con el maíz nixtamalizado y el maíz + amilasas; sin embargo en el caso del maíz germinado, el microorganismo no se eliminó completamente como en el caso del

maíz remojado. Se sabe que durante la germinación hay producción y degradación de muchos compuestos, entre ellos las proteínas, así que posiblemente estas sustancias pueden estar contrarrestando el efecto de la acidificación del medio en esta fermentación, permitiendo la sobrevivencia del microorganismo hasta las 72 horas. De hecho, a pesar de haberse obtenido la mayor acidez titulable (Fig. 13) y la mayor concentración de ácidos en el maíz germinado (Tabla 10), sus valores de pH fueron en todo momento mayores que los del maíz remojado y maíz + amilasas (Fig. 12).

Se han reportado porcentajes de ácido láctico para otros alimentos fermentados de maíz, que involucran la germinación y/o el remojo del grano en su elaboración (Steinkraus, 1996). En el ogi (remojo), se han encontrado concentraciones de ácido láctico de 1.06% al final de la fermentación; en el caso del tesgüino (germinación) de 0.41%; en la cerveza kaffir y en el busaa (germinación) de 0.3 a 0.6% y 0.99% de ácido láctico respectivamente. Estas concentraciones son menores a las encontradas en este estudio (Fig. 13 y Tabla 10), pero se trata de fermentaciones naturales en las que participan bacterias lácticas homo y heterofermentativas, así como otros microorganismos que compiten por los azúcares y que consumen ácidos.

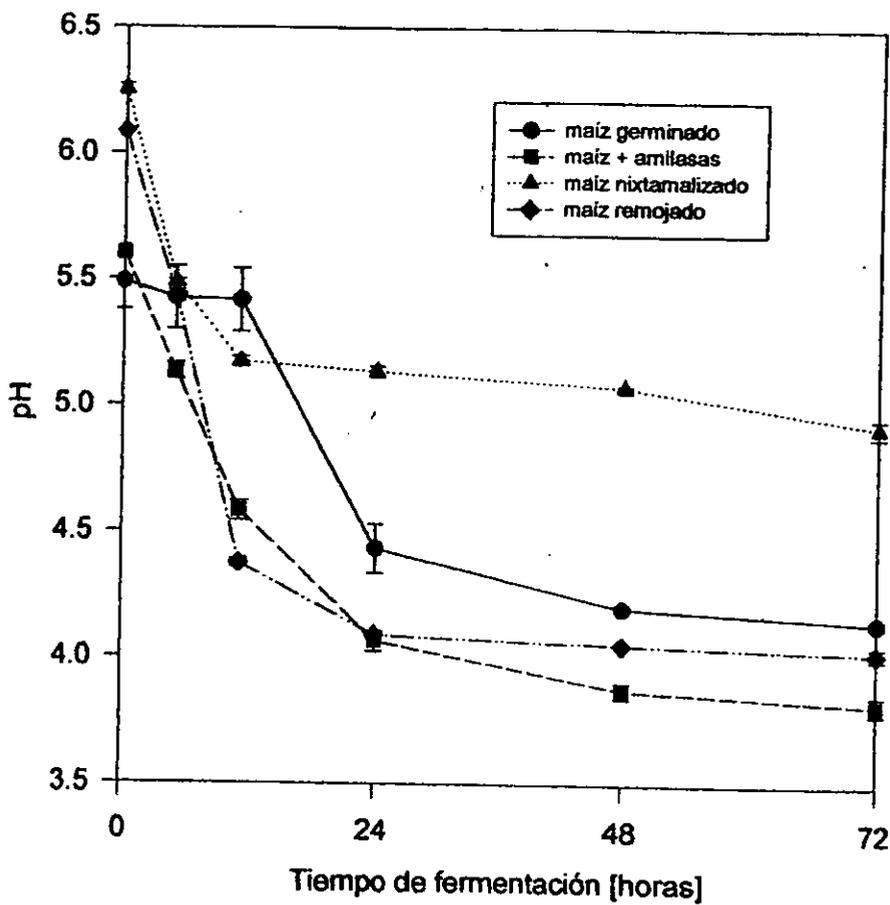


Figura 12. Cambios de pH durante las fermentaciones de *L. plantarum* en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C.

**Tabla 10.** Concentraciones de ácidos encontrados al inicio y al final de las fermentaciones de maíz sometido a diferentes tratamientos.

	g/100g de masa en base seca				Relación láctico/acético
	Ácido Láctico		Ácido Acético		
Tiempo de fermentación	0 h	72 h	0 h	72 h	72 h
Maíz remojado	0.3± 0.05	2.3± 0.29	0.06± 0.01	0.3± 0.02	7.7
Maíz + amilasas	0	0.6± 0.06	0	0.05± 0.002	12
Maíz germinado	0.5± 0.05	2.4± 0.004	0.03± 0.007	1.46± 0.06	1.6
Maíz nixtamalizado	0.09± 0.005	0.7± 0.10	0.05± 0.01	0.3± 0.02	2.3

Con el maíz + amilasas se obtuvo la menor velocidad de acidificación inicial del medio (Fig. 12), los menores valores de acidez titulable (Fig. 13) y las menores concentraciones de ácido láctico y acético (Tabla 10); sin embargo, se obtuvo el menor valor de pH final. Es posible que la menor capacidad amortiguadora de este medio se deba a que a diferencia de los anteriores, estén menos disponibles sustancias como las proteínas o desde un principio, como se destruye la integridad de los granos (maíz y trigo), ya que se muelen antes del remojo, estas sustancias no se lleguen a formar. Se han reportado valores semejantes al 0.36% de ácido láctico obtenido para el maíz + fuente de amilasas de este estudio: 0.4 a 0.5% de ácido láctico para el mahewu (maíz + amilasas) y 0.3 a 0.5% para el uji (maíz + amilasas) a 40 horas de fermentación (Steinkraus, 1996) (Fig. 13 y Tabla 11 y 18).

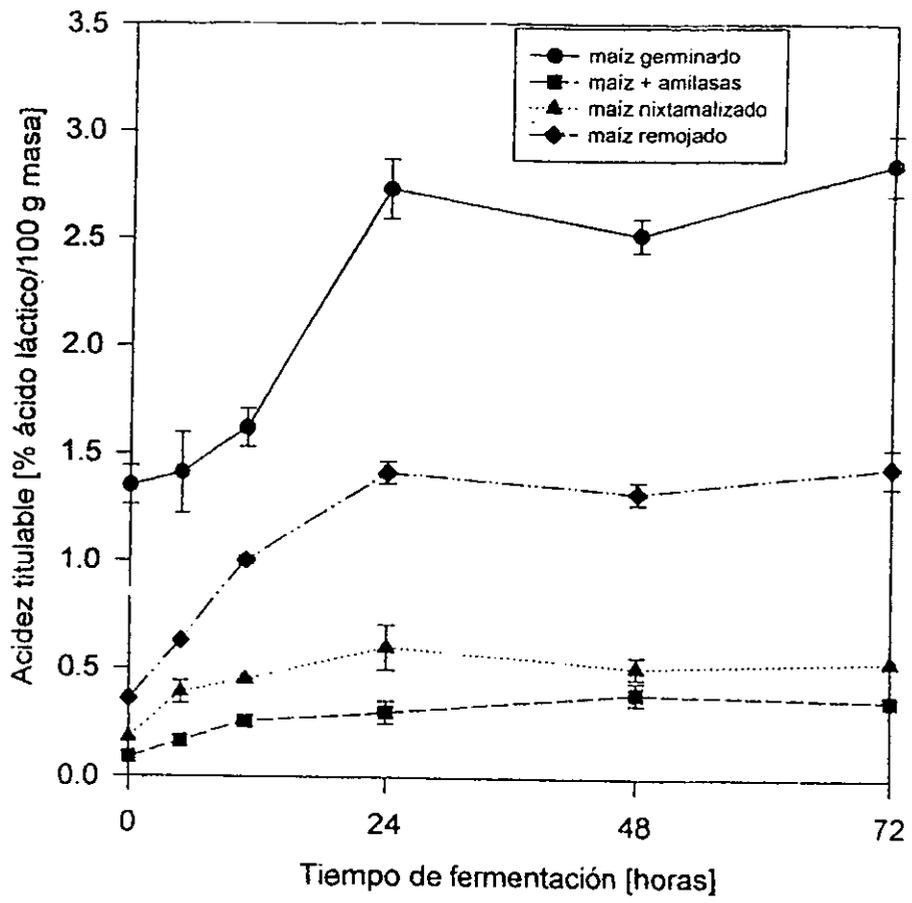


Figura 13. Acidez titulable durante las fermentaciones de *L. plantarum* en maíz con diferentes tratamientos incubados a 30°C.

A pesar de que la concentración de azúcares en el nixtamal fue la menor (Tabla 8), la velocidad de crecimiento de *L. plantarum* fue similar a la del maíz remojado y mayor que la del maíz + amilasas (Fig. 11). Es posible que *L. plantarum* tenga oportunidad de crecer más en este sustrato al neutralizar el hidróxido de calcio remanente en la masa los ácidos producidos así como aprovechar la disponibilidad de otros nutrientes presentes en el maíz ya nixtamalizado.

Se obtuvieron valores de pH finales de 4.0, 3.8, 4.1 y 4.9 en el caso del maíz remojado, maíz + amilasas, maíz germinado y maíz nixtamalizado respectivamente. Según los datos reportados en la literatura para alimentos de maíz (Tabla 11) no existe un efecto del tipo de tratamiento en su pH final, aunque es difícil compararlos entre sí, ya que seguramente su microbiota es diferente, así como su tiempo de fermentación. Los valores de pH finales para los alimentos fermentados fueron similares o ligeramente menores a los que se obtuvieron en este estudio.

**Tabla 11.** Datos reportados de contenido de azúcares, acidez titulable y pH para algunos alimentos fermentados de maíz (Steinkraus, 1996).

Tipo de tratamiento	alimento fermentado	azúcares (% p/p en base seca)	acidez titulable (% de ácido láctico/tiempo de fermentación [horas])	pH / tiempo de fermentación [horas]
Remojo	ogi	NR	1.06/72	3.6/72
	kenkey	NR	NR	3.5/72
	este estudio	glucosa 5.2 fructosa 0 sacarosa 8.5 maltosa 4.9	1.44/72	4.0/72
Maíz + amilasas	mahewu	NR	0.4-0.5/36	3.5/36
	uji	*0.42-0.67 % de sacarosa	0.3-0.5/40	3.5/40
	togwa	NR	NR	3.8/24
	este estudio	glucosa 0 fructosa 0 sacarosa 0.2 maltosa 9.3	0.36/72	3.8/72
Germinación	pito	NR	NR	4.4/12-24
	bussa	NR	0.99/72	3.5/72
	C. kaffir	NR	0.3-0.6/40	3.3-3.5/40
	tesgüino	NR	0.41/72	NR
	este estudio	glucosa 35.3 fructosa 0 sacarosa 61.4 maltosa 38.4	2.85/72	4.1/72
Nixtamalización	pozol	NR	NR	3.9/192
	pozol ladino ▲	glucosa 0.04	0.79/48	NR
	pozol indígena ▲	sacarosa 0.04	0.96/48	NR
	este estudio	glucosa 0.008 fructosa 0.007 sacarosa 0 maltosa 0.2	0.54/72	4.9/72

NR = no reportado

\*base húmeda

▲(Santillana, 1995)

Para el caso del maíz nixtamalizado, que es el único en el que se aseguró la eliminación de la actividad enzimática del grano, se calcularon los rendimientos de biomasa y de productos. A las 72 h de fermentación se obtuvo una cuenta de  $6.3 \times 10^8$  ufc/ml, sabiendo que el peso de un sólo microorganismo es de alrededor

de  $1 \times 10^{-12}$  g (Bailey y Ollis, 1977), la cantidad de biomasa sería de  $6.3 \times 10^{-4}$  g células/g de masa en base húmeda ó  $3.15 \times 10^{-5}$  g células/g masa en base seca. Sustituyendo este valor en la definición de rendimiento ( $Y = \text{g células/g azúcares}$ ), se necesitarían  $6.3 \times 10^{-5}$  g ó  $3.5 \times 10^{-7}$  mmoles de glucosa para formar esta biomasa. El microorganismo utiliza los azúcares para crecer (producción de biomasa), para formar productos de fermentación (ácido láctico, ácido acético o etanol y  $\text{CO}_2$  según el tipo de fermentación) así como para el mantenimiento de las células. Si se convierten todos los azúcares de la masa (glucosa+fructosa+sacarosa+maltosa) que el microorganismo consumió a equivalentes de glucosa, tendríamos 2.1 g de glucosa/100g de masa ó 16.8 mmoles

de glucosa en base seca. En una fermentación heteroláctica se producen 1 mol de ácido láctico y 1 mol de ácido acético por cada mol de glucosa (Gottschalk, 1986). En este estudio se produjeron 7.7 mmoles (0.7 g) de ácido láctico y la concentración de glucosa requeridas para la producción de biomasa es despreciable.

Como la concentración de azúcares consumidos fue de 16.8 mmoles, quedarían 9.1 mmoles para mantenimiento. Se considera que la concentración de azúcares consumidos sí justifica la concentración de ácidos producidos, tomando en cuenta que existen errores en los cálculos, al considerar que todos los azúcares eran glucosa.

En general, el pretratamiento del maíz previo a la fermentación a excepción de la germinación, no tuvo efectos muy marcados en el crecimiento del microorganismo, ya que todas las fermentaciones tuvieron cuentas microbianas parecidas; afectó la velocidad de crecimiento y las cuentas máximas alcanzadas no dependieron de la concentración inicial de azúcares. Sin embargo la sobrevivencia de *L. plantarum* sí dependió del tipo de pretratamiento, siendo mayor en los medios más amortiguados.

En cambio, la acidificación: acidez titulable (Fig. 13) y la concentración de ácidos (Tabla 10) sí fue proporcional a la concentración inicial de azúcares, con la excepción del maíz nixtamalizado.

Se observó que *L. plantarum* continuó acidificando el medio aún cuando sus números ya no aumentaban. Este desacoplamiento entre el crecimiento y la acidificación ya se ha reportado (Thompson y Gentry-Weers, 1994).

A pesar de que en el maíz + amilasas las enzimas pudieron haber seguido actuando durante la fermentación para aumentar la concentración de glucosa y maltosa, se observó el consumo total o parcial de todos los azúcares por *L. plantarum* durante la fermentación, aunque éste puede ser subestimado. El consumo de azúcares en el maíz + amilasas fue mayor al consumo de azúcares en el maíz nixtamalizado (donde no había la posibilidad de que actuaran las enzimas endógenas). Sin embargo, la producción de ácidos fue mayor en el maíz nixtamalizado (0.7% de ácido láctico y 0.3% de ácido acético) que en el maíz + amilasas (0.6% de ácido láctico y 0.05% de ácido acético). Esto sugiere que *L.*

*plantarum* pudiera estar utilizando otro sustrato para acidificar en el maíz nixtamalizado. Las hemicelulosas del grano constituyen una posibilidad, ya que por una parte se sabe que se solubilizan con el tratamiento alcalino (Illescas, 1943) y por otra se ha detectado que una proporción importante de bacterias lácticas del pozol son capaces de degradar un polímero de pentosas (xilano) y de fermentar las pentosas.

Como puede observarse en la Tabla 10, los tratamientos del maíz no solamente afectaron en el grado de acidificación, sino en el tipo de metabolismo de la cepa, ya que la relación láctico/acético fue diferente en cada caso. Como resultado de los diferentes tratamientos, los sustratos contenían diferentes proporciones de azúcares y en todos los casos (con la excepción del maíz germinado, donde se observó un aumento en su concentración) se confirmó que *L. plantarum* los consumía (Tabla 8).

## CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados el pretratamiento del maíz previo a la fermentación:

◆ Afecta la formación y concentración de azúcares. La germinación, el remojo y la adición de una fuente externa de amilasas, aumenta la concentración de azúcares en el grano con respecto al grano sin pretratamiento, mientras que la nixtamalización los disminuye. La mayor concentración de azúcares se encontró en el maíz germinado y la de oligosacáridos en las muestras de maíz germinado y de maíz remojado.

◆ Afecta la velocidad de crecimiento de *L. plantarum*: se encontró la mayor velocidad en maíz nixtamalizado y remojado, la menor en maíz + amilasas y se inhibió en las primeras horas en el maíz germinado. Sin embargo a las 48 h las cuentas microbianas fueron muy semejantes, no habiendo diferencia de crecimiento microbiano entre los pretratamientos. El crecimiento parece estar limitado por el pH más que por la concentración de azúcares.

◆ Afecta la acidificación del sustrato: la mayor se observó en maíz germinado que tenía la mayor concentración de azúcares; sin embargo existió mayor acidificación en el maíz nixtamalizado que en el maíz + amilasas, a pesar de las diferencias en las concentraciones iniciales de los azúcares en cada pretratamiento.

◆ Afecta el tipo y la concentración de ácidos producidos (láctico y acético).

## **RECOMENDACIONES**

⇒ Hacer un control de las fermentaciones de maíz con los diferentes pretratamientos para conocer la concentración de azúcares producidos durante la fermentación por acción de las enzimas exógenas y así determinar el consumo de azúcar por el microorganismo así como sus rendimientos de biomasa y de productos.

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1. Medios de cultivo

#### I. Caldo MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) g/l. (OXOID CM 359)

	Caldo	Agar	Modificado
Peptona	10	10	10
Polvo "Lab-Lemco"	8	8	8
Extracto de levadura	4	4	4
Glucosa	20	20	0.5
Almidón	-	-	10
Tween 80	1 ml	1 ml	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	2	2
Acetato de Na·3H <sub>2</sub> O	5	5	5
Citrato triamónico	2	2	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	0.05
Agar bacteriológico	-	10	-
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml

#### II. Agar Cuenta en Placa g/l (OXOID CM325)

	Agar
Triptona	5
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1
Agar	9
Agua destilada	1000 ml

#### III. Caldo APT g/l (DIFCO 0655-17-9)

	Caldo
Extracto de levadura	7.5
Triptona	12.5
Dextrosa	10
Citrato de sodio	5
Hidrocloruro de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	5

Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Complejo monooleato de "sorbitan"	0.2
Agua destilada	1000 ml

#### **IV. Caldo Nutritivo g/l (BIOXON 103-1)**

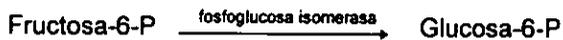
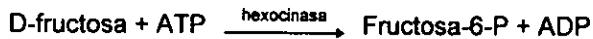
	<b>Caldo</b>
Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Agua destilada	1000 ml

## APÉNDICE 2. Principio de los sistemas enzimáticos para la cuantificación de Glucosa, Fructosa, Sacarosa y Maltosa.

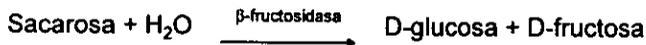
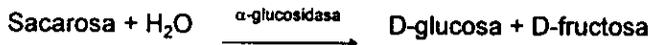
El sistema se basa en la cuantificación espectrofotométrica a 340nm del NADPH formado a partir de la glucosa-6-P mediante la siguiente reacción:



La glucosa y la fructosa se convierten en glucosa-6-P mediante las siguientes reacciones:



La maltosa y la sacarosa se hidrolizan primero mediante las reacciones:



Posteriormente la glucosa formada se transforma en glucosa-6-P. De esta manera, se pueden cuantificar los hidratos de carbono, ya que se forma un mol de NADPH por cada mol de glucosa, fructosa, sacarosa y por cada medio mol de maltosa.

El orden de adición de los reactivos para la cuantificación de los azúcares se muestran en las tablas 12 y 13, según el caso:

**Tabla 12.** Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de D-glucosa/D-fructosa.

Pipetear en las celdas	Blanco	Muestra
Solución 1*	0.333 ml	0.333 ml
Muestra	0.033 ml	0.033 ml
Agua desionizada	0.666 ml	0.633 ml
Mezclar, leer las absorbancias de las soluciones ( $A_1$ ) aproximadamente después de 3 min. Y empezar la reacción por la adición de:		
Suspensión 2*	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, esperar el final de la reacción (10-15 min.), leer las absorbancias de las soluciones ( $A_2$ ). Añadir:		
Suspensión 3*	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, leer las absorbancias de las soluciones después de 10-15 min( $A_3$ ).		

- \*Solución 1: Buffer trietanolamina, pH=7.6/NADP/ATP.  
 Suspensión 2: Hexocinasa/Glucosa-6-P deshidrogenasa.  
 Suspensión 3: Fosfoglucosa isomerasa.

**Tabla 13.** Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de Maltosa/Sacarosa/D-glucosa.

Pipetear en las celdas	Blanco maltosa	Muestra maltosa	Blanco sacarosa	Muestra sacarosa	Blanco glucosa	Muestra glucosa
Solución 1*	0.066 ml	0.066 ml	-	-	-	-
Solución 2*	-	-	0.066 ml	0.066 ml	-	-
Muestra	-	0.033 ml	-	0.033 ml	-	0.033 ml
Mezclar e incubar a 20-25°C por 20 min.. Añadir:						
Solución 3*	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml	0.333 ml
Agua desionizada	0.600 ml	0.567 ml	0.600 ml	0.567 ml	0.667 ml	0.633 ml
Mezclar, leer las absorbancias de las soluciones después de 3 min. ( $A_1$ ) Empezar la reacción por la adición de:						
Suspensión 4*	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml	0.007 ml
Mezclar, esperar el final de la reacción (10-15 min.) y leer las absorbancias de las soluciones ( $A_2$ ).						

- \*Solución 1: Buffer de acetatos, pH=6.6/ $\alpha$ -glucosidasa.
- Solución 2: Buffer de acetatos, pH=4.6/ $\beta$ -fructosidasa.
- Solución 3: Buffer trietanolamina, pH=7.6/NADP/ATP.
- Suspensión 4: Hexocinasa/Glucosa-6-P deshidrogenasa.

El análisis se realizó con celdas desechables de metacrilato de 1.5 ml con un paso de luz de 1 cm. El equipo utilizado (Spectronic Genesis 5 de Milton Roy) se calibró contra agua. Las determinaciones se llevaron a cabo entre 20 a 25°C a 340 nm.

Para calcular la concentración de los azúcares se tiene la siguiente ecuación:

$$C = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000(x 2\blacklozenge)} \times \Delta A_x \quad [\text{g/l}]$$

♣ Sólo cuando se analiza maltosa.

Donde:

V = volumen final [ml]

v = volumen de la muestra [ml]

PM = peso molecular de la sustancia a ser analizada [g/mol]

d = paso de luz [cm]

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = 6.3 [l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

Y  $\Delta A_x$ , se determina a partir de las diferencias de las absorbancias en base

a lo siguiente:

$$\Delta A_{\text{glucosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra glu}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco glu}}$$

$$\Delta A_{\text{fructosa}} = (A_3 - A_2)_{\text{mtra fruc}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanco fruc}}$$

$$\Delta A_{\text{maltosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra malt}} - (A_2 - A_1)_{\text{mtra sac}}$$

$$\Delta A_{\text{sacarosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra sac}} - (A_2 - A_1)_{\text{mtra glu}}$$

Si la muestra ha sido diluida durante la preparación, el resultado de la ecuación debe ser multiplicado por el factor de dilución F.

Cuando se analicen muestras sólidas o semi-sólidas que necesiten pesarse para la preparación de la muestra, el resultado debe calcularse a partir de la cantidad pesada.

Según la metodología descrita en los 2 sistemas enzimáticos comerciales empleados (Boehringer 139 106 y Boehringer 1 113 9509), los límites de detección para la glucosa y la fructosa expresados en g/100g de masa es de 0.001 y para la sacarosa y la maltosa es de 0.005.

**APÉNDICE 3. Datos de las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos.**

**Tabla 14.** Cambios de pH y crecimiento microbiano de *L. plantarum* amilasa - durante la fermentación en maíz remojado incubada a 30°C

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Crecimiento microbiano (log ufc/ml)
0	6.0	6.8
5	5.4	8.5
11	4.3	9.5
24	4.0	9.3
48	4.0	7.5
72	4.0	<2

**Tabla 15.** Cambios de pH y crecimiento microbiano de *L. plantarum* amilasa - durante la fermentación en maíz + fuente de amilasas incubada a 30°C.

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Crecimiento microbiano (log ufc/ml)
0	5.6	6.9
5	5.1	7.8
11	4.5	8.6
24	4.0	8.7
48	3.8	8.2
72	3.8	7.4

**Tabla 16.** Cambios de pH y crecimiento microbiano de *L. plantarum* amilasa - durante la fermentación en maíz germinado incubada a 30°C.

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Crecimiento microbiano (log ufc/ml)
0	5.4	6.0
5	5.4	6.1
11	5.4	6.2
24	4.4	8.8
48	4.2	7.5
72	4.1	6.3

**Tabla 17.** Cambios de pH y crecimiento microbiano de *L. plantarum* amilasa - durante la fermentación en maíz nixtamalizado incubada a 30°C.

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Crecimiento microbiano (log ufc/ml)
0	6.2	6.9
5	5.4	8.8
11	5.1	9.1
24	5.1	9.3
48	5.0	9.1
72	4.9	8.8

**Tabla 18.** Cambios en la acidez titulable de *L. plantarum* amilasa - durante las fermentaciones en maíz con diferentes tratamientos incubadas a 30°C

Tiempo de fermentación (horas)	Acidez titulable (ácido láctico/100g mtra seca)			
	Maíz + amilasas	Maíz remojado	Maíz germinado	Maíz nixtamalizado
0	0.09	0.36	1.35	0.18
5	0.16	0.63	1.41	0.39
11	0.25	1.00	1.62	0.45
24	0.30	1.41	2.73	0.60
48	0.39	1.32	2.52	0.51
72	0.36	1.44	2.85	0.54

## BIBLIOGRAFÍA

- \* Baduí D.S. (1993) *Química de los Alimentos*. 3ª edición. Ed. Alhambra. 45-105.
- \* Bailey J.E. y Ollis D.F. (1977) *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Gill-Book Company.
- \* Bewley J.D. y Black M. (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Segunda edición. Plenum Press.
- \* Boyer C.D. y Shannon J.C. (1987) Carbohydrates of the kernel. En: *Corn: Chemistry and Technology*. Watson S.A. y Ramstad P.E. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, 253-272.
- \* Bressani R., Paz y Paz R., Scrimshaw N.S. (1958) Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *Agricultural and Food Chemistry*. 6 (6), 770-773.
- \* Cantliffe D.J., Hannah L.C., Zack C.D. (1986) Carbohydrate metabolism during germination in endosperm mutants of maize. Annual meeting of the american society of plant physiologists. U.S.A.
- \* Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G. y Guzmán G.J. (1955) El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia México*, 15, 27-30.
- \* Cruz Ulloa S., Ulloa M. (1973) Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 24, 423-457.

- fermentados tradicionales de maíz*. Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa, Instituto Nacional del Consumidor, Dirección General de Culturas  
Populares, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, 39.
- \* Flores E. Ma.Teresa. (1996) *Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol* Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM.
  - \* Fox B.A., Cameron A.G. (1982) *Food Science a Chemical Approach*. Hodder y Stoughton, 142, 165.
  - \* Giraud E., Brauman A., Keleke S., Lelong B. y Raimbault M. (1991) Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 379-383.
  - \* Gómez G. A. (1997). *Modificación de la expresión génica por bencil-adenina en ejes embrionarios de maíz, determinada por Differential Display*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
  - \* Gomez M.H., McDonough C.M., Rooney L.W. y Waniska R.D. (1989) Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. *Journal of Food Science* **54**, (2), 330-336.
  - \* Gottschalk Gerhard (1986) *Bacterial Metabolism*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer-Verlag, New York.
  - \* Hesseltine C.W., Wang H.L. (1979) *Chemistry and Industry* **12**, 393-399.
  - \* Holzapfel W.H. (1989). Industrialization of mageu fermentation in South Africa. *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkrauss (Ed.) Marcel Dekker, N York, 285-328.

- \* Illescas, Rafael (1943) La teoría química de la formación del nixtamal. Revista de la sociedad mexicana de historia natural. Tomo IV, Nos.3-4.
- \* Inglett G.E. (ed.) (1970) *Corn: culture, processing, products*. The AVI Pub. Co. Inc. Westport, Conn. 123-137.
- \* Jackson D.S., Owen C., Waniska R.D., Rooney L.W. (1988) Characterization of starch cooked in alcali by aqueous high-performance size exclusion chromatography *Cereal Chemistry* **65**(6), 493-496.
- \* Kent-Jones y Amos (1967) *Modern Cereal Chemistry*. Food Trade Press Ltd. London, 131-136.
- \* Kigel Jaime, Galili Gad (ed.) (1995) *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, Inc. 447-474.
- \* Mensah P., Tomkins A.M., Drasar B.S. y Harrison T.J. (1991) Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 203-210.
- \* Museo Nacional de Culturas Populares (1987) *El maíz*. García Valadés Editores. México, 114.
- \* Nieto E., Vázquez E. (1993) Las fermentaciones tradicionales del maíz. Resultados de una encuesta. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wacher y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, 47-51.

- \* Nout M.J.R., Rombouts F.M. y Havelaar A. (1989) Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **8**, 351-361.
- \* Olympia M. Shinmyoa O.H. y Takano M. (1992) Lactic acid bacteria in a fermented fishery product "Burong Bangus". *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**(3), 193-197.
- \* Osborne, D.J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination *Can.J.Bot.* **61**: 3568-3577.
- \* Pagano E.A. y Krisman C.R. (1993) Endosperm alpha-1,4-alpha-1,6-glucopolysaccharides utilization during germination of sweet corn and other maize genotypes *Starch* **45** (6), 203-205.
- \* Paredes-López O. y Saharopulos. (1982) Scanning electron microscopy (SEM) studies of limed corn kernels for tortilla making *J. of Food Technology* **17**, 687-693.
- \* Pearson D. (1976) *The Chemical Analysis of Foods*. 7<sup>th</sup> edition. Chemical Publishing Co. New York, 240-243.
- \* Pflugfelder R.L., Rooney L.W. y Waniska R.D. (1988) Dry matter losses in commercial corn masa production *Cereal Chemistry* **65**, (2), 127-132.
- \* Pompeyo C., Suárez Gómez M., Gasparian S. y Morlon-Guyot J. (1993) Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**, 266-269.

- \* Santillana R. (1995) *Desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el análisis químico del nixtamal y del pozol*. Tesis de M. en Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- \* Sribir Sen, Chakrabarty S.L. (1984) Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes *J. Ferment. Technol.*, **62**, (5), 407-413.
- \* Steinkraus K.H. (ed.) (1989) *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker. New York, 439.
- \* Steinkraus K.H. (ed.) (1996) *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker. New York, 776.
- \* Steup M. (1988). *Starch Degradation* Journal Press (ed.) The biochemistry of plants, **14**: Carbohydrates, Academic Press, 255-296.
- \* Thompson J. y Gentry-Weers C.R. (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. En: deRoissart H. y Luquet F.M. Bactéries Lactiques, aspects fondamentaux et technologiques. Loriga, Uriage, Francia, 239-290.
- \* Trejo-González A., Feria-Morales A. Wild-Altamirano C. (1982) The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation. *Advances in Chemistry Series N° 198. Modification of proteins*. R.E. Feeney y J.R. Whitaker (eds.) American Chemical Society, 245-263.
- \* Valderrama P., Ramírez C. (1993) Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wacher y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, 63-67.

- \* Wachter Carmen (1995) *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos) Facultad de Química, UNAM.
- \* Watson S.A., Ramstad P.E. (ed.) (1987) *Corn: Chemistry and Technology* The American Association of Cereal Chemists. 53-69, 253-272, 410-413.
- \* Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F. (ed.) (1984) *Starch: Chemistry and Technology*. 2<sup>nd</sup> edition, 87-90, 102, 676-689.
- \* Wood B.J.B., Holzapel W.H. (ed.) (1995) *The Genera of Lactic Acid Bacteria* Vol. 2. Blackie Academic & Professional 19-28.