



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

**CAMBIOS QUÍMICOS Y REOLÓGICOS DURANTE LA  
FERMENTACIÓN DE MASA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTAN:

**ALONDRA GONZÁLEZ FLORES**

**ALFREDO ESAÚ JIMÉNEZ OCAMPO**



MÉXICO, D.F.

2010



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:** Profesor: MC. Francisca Aída Iturbe Chiñas

**VOCAL:** Profesor: Dr. Alberto Tecante Coronel

**SECRETARIO:** Profesor: Dra. Gloria Díaz Ruiz

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MC. Sandra Pérez Munguía

**2° SUPLENTE:** Profesor: MC. Armando Conca Torres

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Lab. 313, Edificio E, Facultad de Química, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. Alberto Tecante Coronel**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**I. A. Mariana Ramírez Gilly**

**SUSTENTANTES:**

---

**González Flores Alondra**

---

**Jiménez Ocampo Alfredo Esaú**





---

## Agradecimientos

Muchas gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la oportunidad que me dieron y por darme sus herramientas más valiosas para crecer y formarme en ella. Llevaré con toda responsabilidad mi compromiso de calidad y evolución para devolver y agradecer todo su gran apoyo.

Mi admiración y gratitud infinita al Dr. Alberto Tecante Coronel por la fe que depósito en nosotros desde el principio en esta prueba de talento y tolerancia, por todo el conocimiento aportado y por su excelente dirección.

A Mariana Ramírez Gilly mi respeto y agradecimiento por la paciencia y humildad con la cual atendió nuestros deseos con inigualable excelencia para la realización de este proyecto vital. Gracias por tu amable actitud constante.

Yolita mía, se que estas aquí, todo dentro de mi te nombra, te puedo sentir, esto y todo lo que soy es para ti.

Lety y Jorge crecer a su lado es lo más bello que me ha sucedido ustedes son lo más vivo y cierto de mi existencia, gracias por su tan dulce y gran amor, por su fe y su sabiduría. Mi corazón siempre estuvo pensando en ustedes; este logro es suyo, por ser el más real y vívido de todos; mi mejor trabajo, y toda mi vida para ustedes, siempre para ustedes. Los amo

A Leobardin por enseñarme que ser débil no es aceptable, que hay que pensar por uno mismo y así lograr lo que se quiere, que es cuestión de autoridad y seguridad personal, para ti hermanito en añoranza de nuestra niñez.





---

Esaú que te puedo decir; gracias por todo, por ser el gran amigo y colega que eres, este camino juntos nos ha unido para siempre. Ya es hora de celebrar este trabajo y esfuerzo inmenso que costó tanto tiempo, tantos años y días, desembotellemos todas las alegrías resguardadas porque el futuro se acerca, despacio, pero viene, con proyectos y buenas noticias. Es el mismo que inventamos nosotros y el azar y cada vez más nosotros y menos el azar. Te quiero mucho.

Flor, Raquel, amigas: Gracias por todos los momentos que hemos compartido, momentos llenos de sentimientos y pensamientos compartidos, sueños y anhelos, secretos, risas y lágrimas, y sobre todo, amistad. Cada preciado segundo quedará atesorado eternamente en mi corazón porque cada año transcurrido, nos ha acercado más. Que el futuro nos traiga la alegría del éxito y una eterna amistad.

Gracias Al Árbol por darme sus mejores frutos, rodeándome en su existencia de personas que me han hecho feliz. Son recuerdos de momentos maravillosos. Árbol te deseo paz, amor, salud, suerte y prosperidad. La experiencia a su lado ha sido única. A todos ustedes Gracias.

Gracias a los seres que hacen que el amor sea carne y vida: Tía Lili, Ariel, Daniel, Abuelito Jorge, Abuelito Mario, Tío Jaime, mis Tehere Maohi: Sandra, Mariana, Ana Irma y Dara y alrededor de ellos a todos los seres que quiero de verdad.

Alondra





---

A mi papá y mamá por el amor, atención, cuidado, esfuerzo, sustento y apoyo incondicionales que han tenido para mí.

A Ulises y Carlos por estar conmigo siempre.

A Alondra por el tiempo, espacio y vida compartidos, entre otras cosas...

Al Dr. Alberto y a Mariana por el apoyo, asistencia, respaldo, orientación y asesoramiento brindados.

A mis amigos de "el árbol" (y afiliados) por todos los momentos alegres, amenos y "bohemios" compartidos y hacer de mi estancia en la Facultad una de mis mejores y gratas etapas de mi vida.

A mi familia, amigos, compañeros, profesores, a todos los que de alguna manera han formado parte de mi vida y han hecho de mí la persona que soy hasta ahora.

A todos ustedes, gracias.

Esaú.





## ÍNDICE

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Introducción</b>   | <b>10</b> |
| <b>Hipótesis</b>  | <b>12</b> |
| <b>Objetivos</b>  | <b>12</b> |
| <b>CAPÍTULO 1</b>   |           |
| <b>Antecedentes</b>   | <b>13</b> |
| 1.1 Fermentación  |           |
| 1.2 Alimentos fermentados                                     |           |
| 1.3 Microorganismos responsables de la fermentación del pozol |           |
| 1.4 Bacterias lácticas  |           |
| 1.5 Bacterias lácticas amilolíticas                           |           |
| 1.6 <i>Lactobacillus plantarum</i>                            |           |
| 1.6.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> A6                       |           |
| 1.7 Enzimas amilolíticas                                      |           |
| 1.8 Maíz  |           |
| 1.8.1 Composición del maíz                                    |           |
| 1.9 Almidón   |           |
| 1.9.1 Estructura del almidón                                  |           |
| 1.9.2 Amilosa   |           |
| 1.9.3 Amilopectina  |           |
| 1.9.4 Gelatinización  |           |
| 1.9.5 Gelificación y retrogradación                           |           |
| 1.10 Reología   |           |
| 1.10.1 Tensión y esfuerzo                                     |           |
| 1.10.2 Deformación  |           |
| 1.10.3 Viscosidad y elasticidad                               |           |
| 1.10.4 Viscoelasticidad                                       |           |
| <b>CAPÍTULO 2</b>   |           |
| <b>Metodología</b>  | <b>34</b> |
| 2.1 Estrategia experimental                                   |           |
| 2.2 Microbiología   |           |
| 2.2.1 Preparación de inóculo                                  |           |





- 2.2.2 Aislamiento y tinción de gram
- 2.2.3 Cuenta en placa
- 2.3 Acondicionamiento de la masa para la fermentación
  - 2.3.1 Preparación de la masa
  - 2.3.2 Inoculación
  - 2.3.3 Fermentación
- 2.4 Análisis microbiológicos
  - 2.4.1 Cuenta de bacterias viables
  - 2.4.2 Cuenta de bacterias contaminantes
- 2.5 Determinaciones reológicas
  - 2.5.1 Barrido de deformación
  - 2.5.2 Barrido de frecuencia
- 2.6 Análisis químicos
  - 2.6.1 pH
  - 2.6.2 Porcentaje de ácido láctico
  - 2.6.3 Contenido de humedad
  - 2.6.4 Azúcares reductores
  - 2.6.5 Determinación de almidón
    - 2.6.5.1 Preparación de la muestra
    - 2.6.5.2 Digestión del almidón
    - 2.6.5.3 Determinación de glucosa
- 2.7 Análisis estadístico

### **CAPÍTULO 3**

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| <b>Resultados y discusión</b>   | <b>46</b> |
| 3.1 Crecimiento microbiano      |           |
| 3.2 pH                          |           |
| 3.3 Porcentaje de ácido láctico |           |
| 3.4 Humedad                     |           |
| 3.5 Azúcares reductores         |           |
| 3.6 Almidón                     |           |
| 3.7 Comportamiento reológico    |           |
| <b>Conclusiones</b>             | <b>82</b> |
| <b>Recomendaciones</b>          | <b>83</b> |
| <b>Bibliografía</b>             | <b>84</b> |
| <b>Apéndices</b>                | <b>90</b> |







---

## Resumen

El propósito principal de este trabajo fue estudiar el efecto y la relación de la actividad amilolítica de *Lactobacillus plantarum* A6 sobre las propiedades viscoelásticas de masa de maíz durante siete días de fermentación, así como los cambios químicos propios de una fermentación. La hipótesis fue que dado que el carácter viscoelástico de la masa de maíz depende básicamente del almidón presente, su hidrólisis provocará una disminución en tal carácter.

Durante el estudio se midieron los módulos dinámicos de la masa, pH, % de acidez, humedad, crecimiento microbiano, concentración de azúcares reductores y concentración de almidón; estas determinaciones se realizaron en diferentes periodos de fermentación pero bajo las mismas condiciones.

Durante los tres primeros días de la primera fermentación, el módulo dinámico  $G'$  disminuyó de 42749 a 36750 Pa, para el cuarto y séptimo día se observó un aumento de este módulo. La misma conducta se presentó en  $G''$ , disminuyendo en los tres primeros días de 6117 a 5394 Pa seguido de un ascenso en sus valores.

En la determinación de pH hubo una disminución desde 6.33 hasta 4.23 provocada por la producción de ácido láctico, la cual aumentó la acidez desde 0.113 hasta 0.90% expresada como ácido láctico.

Por otro lado, se midió el crecimiento microbiano en los medios ACP (Agar Cuenta en Placa), MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y MRS-A (Man, Rogosa y Sharpe-Almidón) con el fin de corroborar que no hubiese contaminación de otros microorganismos que no fuera *L. plantarum* A6. El crecimiento fue muy similar en los tres medios, es decir, el número de colonias encontradas a lo largo de la fermentación fue casi el mismo, lo que indicó que no hubo contaminación de otro tipo de bacterias. Se comenzó la fermentación con una cuenta de  $1.6 \times 10^7$  UFC/g de masa de *L. plantarum* A6 y se finalizó con una cuenta de  $4 \times 10^{10}$  UFC/g de masa.

La humedad permaneció constante durante todo el tiempo de fermentación, por lo que los cambios reológicos no se pueden atribuir a variaciones en ésta.





---

En conclusión la actividad amilolítica de *L. plantarum* A6 se reflejó en cambios químicos y reológicos ocurridos durante la fermentación de masa de maíz con este microorganismo, sin embargo, no se encontró una clara relación entre la hidrólisis del almidón con la disminución del carácter elástico de la masa, pues durante los tres primeros días hubo un esperado aumento en el carácter viscoso pero durante los siguientes días este comportamiento se invirtió.





---

## Introducción

El maíz es el cereal más importante en México, el que tiene mayor identidad con la cultura mexicana y fue el cereal que ocupó el primer lugar en cosecha de mayor abundancia en el mundo en el año 2007 (FAOSTAT, 2009).

Los productos de maíz que se consumen en México son muy variados, en su mayoría producidos con maíz nixtamalizado que es determinante en el mejoramiento del valor nutritivo del maíz, y en numerosos países en vías de desarrollo proporciona más de la mitad de las calorías diarias requeridas (El maíz como alimento, 2009). Muchos de estos alimentos son elaborados tradicionalmente al dejar fermentar la masa sin añadir inóculos, es decir, sólo actúan microorganismos naturalmente presentes en el maíz, los utensilios y el medio ambiente, y generalmente están constituidos por microbiotas complejas.

Cada cultura está íntimamente ligada con ciertos alimentos que forman la base de su dieta (Vargas, 1984). México cuenta con cerca de 56 grupos étnicos (Leyva, 1980) muchos de los cuales han consumido alimentos fermentados desde épocas prehispánicas. El cultivo de maíz debió haberse iniciado hace aproximadamente 7000 años como base de la alimentación de los pueblos prehispánicos de México y Centroamérica, por lo que es lógico pensar que la mayoría de los alimentos fermentados de nuestro país y de otros países se preparen a partir de maíz.

Existe una gran variedad de alimentos fermentados de maíz, en especial de bebidas tanto alcohólicas como refrescantes, cuyo consumo es habitual entre la población de las distintas regiones de México. Algunos ejemplos de este tipo de alimentos son la tortilla agria, pozol y atole agrio, entre otros.

Recientemente se han hecho estudios para identificar la microbiota natural responsable de la fermentación del pozol y se ha encontrado que son las bacterias lácticas las que predominan desde el inicio de la fermentación de las masas y las encargadas de acidificar el producto (Wacher *et al.*, 1993). En estos estudios se determinó que las bacterias lácticas son responsables del 90 al 97% de la actividad total de la microbiota. El 40% de las bacterias lácticas presentes en la





---

masa de maíz son inicialmente amilolíticas y su proporción disminuye hasta el 3% después de 72 horas de fermentación (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003). La alta concentración de bacterias lácticas amilolíticas sugiere su importancia durante la fermentación de la masa de maíz, principalmente durante las primeras 24 horas.

El almidón presente en la masa es hidrolizado por las amilasas de dichas bacterias durante la fermentación. Los productos de la hidrólisis son oligosacáridos que varían en la longitud de su cadena. Las amilasas podrían actuar, dependiendo del tipo de amilasa presente en los microorganismos, en las regiones internas del sustrato y por tanto causarían un rápido decremento en la viscosidad de la masa constituida principalmente por almidón; estos cambios pueden ser medidos por medio de pruebas reológicas.

En el presente trabajo se plantea estudiar, principalmente, el efecto de la actividad amilolítica durante la fermentación de la masa de maíz sobre sus propiedades viscoelásticas.





---

## Hipótesis

La degradación del almidón con producción de hidratos de carbono de cadena más corta durante la fermentación de masa de maíz por bacterias con acción amilolítica, provocará un descenso en su viscoelasticidad. Esto permitirá conocer la relación entre la hidrólisis del almidón y los cambios en las propiedades viscoelásticas de la masa, pues se asume que esta macromolécula es la que le confiere dichas propiedades a la masa. Además, las variaciones en el comportamiento reológico podrán relacionarse con los cambios químicos que ocurran en la masa.

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar los cambios químicos y reológicos que ocurren durante la fermentación por un microorganismo amilolítico, *L. plantarum* A6, en masa de harina de maíz nixtamalizado, para conocer la intensidad de dichos cambios, la escala de tiempo sobre la cual ocurren y de que manera están relacionados con el comportamiento mecánico de la masa.

### Objetivos específicos

Relacionar el efecto de la degradación de almidón y producción de azúcares reductores causada por la actividad amilolítica de *Lactobacillus plantarum* A6 sobre las propiedades viscoelásticas en masa preparada con harina de maíz nixtamalizado comercial durante su fermentación para determinar si se modifica el comportamiento mecánico de la masa.

Seguir la actividad de *L. plantarum* A6 en la fermentación de masa preparada con harina de maíz nixtamalizado comercial mediante pruebas químicas, microbiológicas y reológicas, para conocer el intervalo de tiempo en el cual los cambios provocados por la fermentación son significativos.





---

## **CAPÍTULO 1**

### **Antecedentes**

#### **1.1 Fermentación**

La fermentación es el proceso metabólico en el que los hidratos de carbono y compuestos afines son oxidados con liberación de energía, en ausencia de cualquier aceptor de electrones de procedencia externa. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente por la escisión de los hidratos de carbono, por consiguiente, solamente se produce la oxidación parcial del compuesto originario y, durante este proceso, solo se libera una pequeña cantidad de energía.

Como organismos fermentadores, las bacterias ácido-lácticas carecen de sistemas funcionales de transporte de electrones ligados al grupo hemo o citocromos y obtienen su energía por fosforilación oxidativa al nivel de sustrato; mientras oxidan los hidratos de carbono no tienen un ciclo de Krebs funcional. Los productos de la fermentación están integrados por algunos que están más reducidos que otros.

En el sentido amplio con el que habitualmente se usa este término, la fermentación es un proceso en el que se producen cambios químicos en un sustrato orgánico por medio de la actividad de enzimas producidas por microorganismos (Jay, 1997).

#### **1.2 Alimentos fermentados**

Un alimento fermentado es el resultado de la transformación de un sustrato, comestible o no, por la actividad metabólica de microorganismos que bajo condiciones adecuadas lleva a la obtención de un producto apto para el consumo con características sensoriales, nutrimentales y en algunos casos toxicológicas distintas de las del sustrato inicial. Los alimentos fermentados juegan un papel





---

muy importante en la alimentación mundial ya que están presentes en cada continente (Steinkrauss, 1983).

La fermentación de alimentos presenta muchas ventajas, algunas de las cuales son:

- Es un método barato de conservación de alimentos (Cooke, 1987; Nout & Motarjemi, 1997).
- Las características sensoriales de los productos fermentados como sabor, aroma, apariencia y consistencia, los hacen más atractivos para el consumidor que los ingredientes no fermentados (Steinkrauss, 1983).
- En muchos casos, el producto fermentado final es una mayor fuente de proteínas, calorías y ciertas vitaminas (Wang, 1981).
- Reduce tiempos de cocción.
- Tanto los cereales como las leguminosas presentan una restringida disponibilidad biológica de los nutrientes debido a la presencia de factores antinutricionales como son los fitatos y los polifenoles (taninos). La fermentación permite disminuir los niveles de estos compuestos y lleva a una mejor disponibilidad biológica de los minerales y el almidón, así como a un incremento en el valor de la eficiencia proteínica (PER) (Nout *et al.*, 1999).
- Eliminación de algunos compuestos potencialmente tóxicos como son, por ejemplo, los glucósidos cianogénicos y linamarina principalmente (Nout *et al.*, 1999).

Sin embargo, la fermentación de alimentos presenta ciertas desventajas: no todos los factores antinutricionales pueden ser degradados por los microorganismos, como por ejemplo las lectinas y los inhibidores de proteasas que se encuentran presentes en las leguminosas y solo pueden ser inactivados por tratamiento térmico (Nout *et al.*, 1999). El riesgo de contaminación por micotoxinas se incrementa debido al hecho de que muchos de los alimentos fermentados requieren de la participación de hongos, principalmente *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.* La fermentación puede eliminar una parte, pero





---

no todos, por lo que es necesario un tratamiento adecuado del sustrato antes de la fermentación para eliminar completamente dichas toxinas (Steinkrauss, 1983).

Existen dos tipos generales de fermentación de alimentos: en estado líquido, llevadas a cabo en sustrato con un mínimo de 80% de humedad y en estado sólido, definida como “el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de líquido libre” (Canel, 1980).

Según Paredes & Harry (1988) los alimentos producidos por fermentación en estado sólido se pueden clasificar en:

- Alimentos producidos por fermentación fúngica en estado sólido, seguida de una fermentación en salmuera que puede o no llevarse a cabo en estado sólido.
- Alimentos producidos por fermentación en estado sólido y llevada a cabo principalmente por bacterias.
- Alimentos producidos por una fermentación ácido-láctica seguida de una fermentación fúngica.
- Alimentos preparados de masas fermentadas.
- Alimentos producidos por fermentación alcohólica.
- Alimentos de ingredientes fermentados.

Como se puede observar en la Tabla 1.1, existe una gran diversidad de alimentos fermentados en estado sólido cuyo sustrato principal es un cereal o fruto con elevado contenido de almidón. También cabe destacar la gran variedad de microorganismos que participan en dichas fermentaciones.

Los principales cambios en la composición nutrimental que sufren los alimentos como resultado de la fermentación en estado sólido se dan en la composición proximal, la concentración de los componentes solubles, la composición de aminoácidos de los alimentos y la composición de vitaminas.

Debido a su composición, el maíz resulta un buen sustrato para el desarrollo de microorganismos, por lo que su fermentación es un procedimiento muy popular en diversas partes del mundo y particularmente en nuestro país, donde existe una







gran variedad de alimentos fermentados de este cereal, en especial de bebidas tanto alcohólicas como refrescantes, cuyo consumo es habitual entre la población de las distintas regiones de México (Tabla 1.2).

Tabla 1.1. Algunos productos amiláceos fermentados en estado sólido (Paredes & Harry, 1988).

| Sustrato     | Producto        | Microorganismos   | Origen geográfico |
|--------------|-----------------|---|-------------------|
| Soya y trigo | Shoyu           | <i>Aspergillus oryzae</i> , bacterias y levaduras                                     | Malasia           |
| Soya y arroz | Miso            | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>                               | China, Japón      |
| Maíz         | Kaanga          | Bacterias y levaduras   | Nueva Zelanda     |
| Arroz        | Idli            | <i>Lactobacillus mesenteroides</i>  | India             |
| Sorgo        | Kisra           | <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>acetobacter spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Sudán             |
| Maíz         | Pozol           | Bacterias, levaduras y hongos   | México            |
| Maíz         | Chicha          | <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , hongos y levaduras                | Perú              |
| Maíz         | Kenkey          | <i>Lactobacillus spp.</i> , hongos y levaduras  | África            |
| Trigo        | Kishk           | <i>Bacillus spp.</i>  | Medio Oriente     |
| Trigo        | Jalebies        | <i>Saccharomyces spp.</i>   | India             |
| Trigo        | Pan agrio       | <i>Torulopsis spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Saccharomyces spp.</i>        | Egipto            |
| Cassava      | Tapé Ketella    | <i>Amylomyces rouxii</i>  | Sureste de Asia   |
| Arroz        | Lao-chao        | <i>Rhizopus chinensis</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus rouxii</i>        | China             |
| Maíz         | Tapé jagung     | <i>Aspergillus rouxii</i> , <i>Endomycopsis burtonii</i>                              | Indonesia         |
| Cassava      | Gari            | <i>Candida spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i>   | Oeste de África   |
| Arroz        | Arroz requemado | <i>Aspergillus candidus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>    | Ecuador           |





Tabla 1.2. Algunos alimentos fermentados mexicanos de maíz (Wacher, 1995)

| Nombre   | Descripción  | Estado donde se consume   |
|--|--|---|
| Agua agria (a)   | Bebida no alcohólica preparada con maíz molido, mezclado con agua y fermentado.  | San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, DF, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca |
| Atole (a)<br>(del azteca atl: agua; olli: liquido viscoso o hule)<br>(e,f) | Bebida no alcohólica preparada con masa de maíz o tortillas y mazorcas.  | San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, DF, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca |
| Atole agrio (a,d)  | Bebida no alcohólica preparada con maíz negro hecho de masa y fermentado durante 4 o 5 días.   | San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, DF, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca |
| Pozol (a,d)<br>(del azteca pozolli: espumoso) (g)                          | Bebida ácida no alcohólica, preparada diluyendo en agua masa de maíz nixtamalizado fermentada.   | Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Quintana Roo                             |
| Sendechó (a)   | Bebida alcohólica (especie de cerveza), preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con "chiles colorados". La harina se mezcla con agua para formar un atole que se hierve, se cuele, se enfría, se le añade el fermento y se deja fermentar. El fermento se prepara a partir de un sendechó anterior. | Estado de México  |
| Tepache (a)<br>(del azteca tepiatl: bebida de maíz) (f)                    | Bebida no alcohólica preparada con granos de maíz y piloncillo o panela, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua.  | Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas   |
| Tesgüino (a)<br>(del azteca tecuín: latir del corazón)<br>(f,g)            | Bebida semejante a la cerveza preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con "catalizadores", que son fermentos de plantas existentes en la región donde se elabora.   | Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco  |
| Tamal agrio (b,d)<br>(del azteca tamall: etimología desconocida) (e,f)     | Tamales elaborados con masa fermentada durante aproximadamente 20 horas. El xokotamal, que contiene únicamente masa, y el etixtamal, que contiene frijol negro, se envuelven en hojas de maíz y el xokotamal piksa se cocina con frijol gordo tierno y se envuelve en hoja de moxte.                             | Puebla (Cuetzalan)  |
| Tortilla agria (c,d)   | Se cuece el maíz con cal y se deja toda la noche sobre la canela. Ya frío se lava y se muele. La masa se reposa medio día y con la masa aceda se hacen torillas  | Quintana Roo, Yucatán   |

(a) De Cruz Ulloa y Ulloa, 1973; (b) De Valderrama y Ramírez, 1993; (c) De Nieto y Vázquez, 1993; (d) Escamilla y col. 1991; (e) Robelo, 1904; (f) Santa María, 1978; (g) Robelo, 1948.





### 1.3 Microorganismos responsables de la fermentación del pozol

La fermentación de masa de maíz es espontánea y se lleva a cabo en estado semisólido con la intervención de una microbiota compleja que se incorpora al nixtamal durante la elaboración de la masa, principalmente durante la molienda (Wacher *et al.*, 2000). La microbiota de la masa fermentada está conformada por diferentes grupos de bacterias, hongos y levaduras.

Algunos hongos y levaduras que se han identificado son: *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium clariforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium lanosoviride*, *Phialophora richardciae*, *Rhizopus nigricans* y *Trichoderma viride* (Ulloa, 1974), *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Hansenula fabianii*, *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, se han detectado bacterias como *Bacillus cereus*, *Paracolobactrum aerogenoides* (Salinas, 1958), *Agrobacterium azotophilum*, *Aerobacter aerogenes* (Ulloa *et al.*, 1987), *Pseudomonas mexicana* y *Escherichia coli*, var. *Neapolitana* (Herrera y Ulloa, 1975), *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. Sin embargo, la flora microbiana está dominada por bacterias ácido-lácticas (Nuraida *et al.*, 1995). Wacher *et al.* (1993) reportan una concentración máxima de  $10^9$  UFC/g para bacterias ácido-lácticas,  $10^7$  UFC/g para bacterias mesófilas aerobias,  $10^9$  UFC/g para enterobacterias,  $10^5$  UFC/g para levaduras y  $10^4$  para hongos.

La masa de maíz nixtamalizada cuenta con una concentración baja de azúcares simples (Santillana, 1995) y una alta concentración de almidón, las cuales aumentan y disminuyen respectivamente durante la fermentación debido a la actividad amilolítica de la microbiota presente, alterando las propiedades viscoelásticas de la masa (Téllez, 2008).





---

Es de suma importancia el estudio del efecto de la dinámica de crecimiento de bacterias con actividad amilolítica durante la fermentación de masas de maíz nixtamalizado utilizadas en la elaboración de alimentos tradicionales sobre los cambios en las propiedades reológicas y químicas para poder establecer condiciones controladas en la elaboración de este tipo de alimentos. Además, el estudio de los cambios calóricos y nutricionales que otorga la fermentación para su utilización como complemento de la lactancia materna para niños en edad temprana.

#### **1.4 Bacterias lácticas**

Las bacterias lácticas tienen como característica común la de producir ácido láctico como catabolito único o mayoritario. Con base en los productos finales del metabolismo de la glucosa, Kluver clasificó las bacterias ácido-lácticas en dos grupos (Jay, 1997): las que producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa se denominan homofermentativas, y las bacterias lácticas que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol a partir de las hexosas se denominan heterofermentativas.

En cuanto a sus exigencias de crecimiento, las bacterias ácido-lácticas necesitan aminoácidos preformados, vitaminas del grupo B y bases púricas y pirimídicas. Si bien son mesófilas, unas son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5 °C y otras a 45 °C. Con respecto al pH de crecimiento, unas son capaces de crecer a pH tan bajo como 3.2, mientras que otras, a pH tan alto como 9.6. Son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Jay, 1997).

Las bacterias lácticas del pozol son el grupo predominante que le confiere las características sensoriales principales a este alimento, como el sabor ácido y aromas que lo definen. El primer reporte sobre la presencia de bacterias lácticas en masas fermentadas corresponde a Steinkraus (Ulloa *et al.*, 1983), el cual confiere el predominio de bacterias lácticas en las primeras horas de fermentación y que quizá sean estas las responsables de la producción de ácido láctico. Esto





---

fue confirmado posteriormente por Silvia Villarreal (1984), Ramírez (1987) y Nuraida (1988), mostrando evidencias directas de que el pozol (masa fermentada) es fundamentalmente una fermentación láctica del maíz.

En estudios más recientes se ha encontrado que las bacterias lácticas son responsables del 90 al 97% de la actividad microbiana en las masas fermentadas. Los miembros más representativos son cocos o bacilos Gram positivos, inmóviles y catalasa negativos (Parés y Juárez, 1997). En la fermentación de masa de maíz, las bacterias lácticas son el grupo dominante durante todo el proceso y, mediante métodos tradicionales de cultivo, se han determinado especies como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuraida *et al.*, 1995).

### **1.5 Bacterias lácticas amilolíticas**

El 40% de las bacterias lácticas presentes en la masa de maíz nixtamalizado inicialmente son amilolíticas, y su proporción disminuye hasta el 3% después de 72 horas de fermentación (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003). Esto indica que las condiciones neutras o ligeramente alcalinas podrían favorecer la presencia de bacterias con actividad amilolítica. La alta concentración de bacterias lácticas amilolíticas sugiere su importancia durante la fermentación de la masa de maíz, principalmente durante las primeras 24 horas. Sin embargo, el número de bacterias lácticas no amilolíticas es alto al final de la fermentación, quizá debido al uso eficiente de mono y disacáridos inicialmente presentes y de otros azúcares productos de la hidrólisis de almidón por las bacterias lácticas amilolíticas. Así mismo, la presencia de bacterias lácticas amilolíticas desde el inicio de la fermentación puede explicar la diversidad microbiana y su importancia en cada etapa del proceso (Ampe *et al.*, 1999).





---

## 1.6 *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* es una bacteria gram positiva no esporulante, en forma de varilla recta, su tamaño generalmente oscila entre 0.9-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho y entre 3-8  $\mu\text{m}$  de largo. Se puede encontrar en forma individual, en pares a menudo reniforme, o formando pequeñas cadenas. Frecuentemente los cultivos viejos presentan pleomorfismo. Casi todos son inmóviles pero se han señalado excepciones. La mayoría de las cepas no pueden cultivarse en medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero de leche.

Es aislada de productos lácteos, vegetales encurtidos, masas agrias, estiércol de vaca, boca humana, tracto intestinal y aguas residuales (Bergey's, 1986). Es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa utilizada para la fermentación de alimentos, principalmente vegetales. Es económicamente importante para el control de la fermentación, ya que previene el desarrollo de microorganismos contaminantes (Chevallier, 1994) y contribuye a las características sensoriales del alimento, aunque también es utilizado como iniciador.

*L. plantarum* está implicada en procesos fermentativos de alimentos para consumo humano. En el "uji", alimento fermentado de maíz, y agua de Kenya, *L. plantarum* es el responsable principal de la fermentación láctica. Giraud *et al.* (1993) aislaron una cepa de *L. plantarum* A6 con actividad amilolítica (alfa amilasa extracelular) de la fermentación de los tubérculos de yuca para la producción de "gari", el cual es consumido en el oeste de África (Akinrele *et al.*, 1962).

Para el caso de algunas masa agrias en la producción de pan, *L. plantarum* participa modificando la elasticidad de la masa (Oura *et al.*, 1982).

### 1.6.1 *Lactobacillus plantarum* A6

Esta bacteria fue aislada de la yuca, un alimento consumido en África. La actividad de la amilasa sólo se encontró asociada con células que crecen a una velocidad





específica máxima de 130 UA/g de células en medio seco,  $1 \text{ h}^{-1}$ , mientras que el pH decrece a 4.9.

La enzima amilolítica sintetizada por *Lactobacillus plantarum* A6 es  $\alpha$ -amilasa extracelular con pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 55 °C.

Su cinética de crecimiento fue similar en almidón y glucosa; la enzima se sintetiza cuando la concentración de glucosa es menos de 6.7 g/L y su actividad es tal que la hidrólisis de almidón no es un factor limitante para el crecimiento en un medio semidefinido (Giraud *et al.*, 1991). Esta enzima consta de formas múltiples con actividad amilasa, con una fracción principal de  $\alpha$ -amilasa de 50 kDa con un pH óptimo de 5.5, temperatura óptima de 65 °C y una  $K_m$  de 2.38 g/L usando almidón soluble como sustrato (Giraud *et al.*, 1994).

*Lactobacillus plantarum* A6 puede utilizar oxígeno pero no tener ninguna cadena respiratoria o el oxígeno consumido, en última instancia, termina como peróxido de hidrógeno. El peróxido probablemente actúa como un arma para excluir a las bacterias que compiten sobre la fuente de alimentos.

## 1.7 Enzimas amilolíticas

Las enzimas que son capaces de hidrolizar las uniones  $\alpha$ -glucosídicas del almidón son llamadas enzimas amilolíticas o  $\alpha$ -glucanasas. Estas enzimas son producidas por animales, plantas y microorganismos (Vihinen & Mäntsälä, 1989). Hay esencialmente cinco grupos de enzimas relacionadas con la hidrólisis del almidón, endo y exoamilasas, que actúan primeramente en las uniones  $\alpha$ -(1,4).

Los productos de la hidrólisis con endoenzimas son oligosacáridos que varían en la longitud de la cadena y tienen configuración  $\beta$  en el C1 en la unidad de glucosa producida. Estas enzimas actúan en las regiones internas del sustrato y por tanto causan un rápido decremento en la viscosidad del almidón gelatinizado. Existen dos variedades de endoamilasas: termoestables y termolábiles. Las  $\alpha$ -amilasas termoestables son de origen bacteriano derivadas de las especies *Bacillus*,





mientras que las  $\alpha$ -amilasas termolábiles son derivadas de fuentes fúngicas, usualmente de *A. oryzae*. La mayoría de estas enzimas son extracelulares, aunque se han encontrado algunas intracelulares. No se explica la razón de la producción de  $\alpha$ -amilasas intracelulares ya que el almidón no puede penetrar en la célula.

Las enzimas de derivación actúan exclusivamente en las uniones  $\alpha$ -(1,6): la  $\beta$ -amilasa, la cual hidroliza unidades de maltosa en el extremo terminal no reductor al final del sustrato, y la glucoamilasa, que hidroliza unidades de glucosa del extremo terminal no reductor al final del sustrato.

Un cuarto grupo, las isomerasas, actúan sobre la glucosa convirtiéndola en fructosa.

Finalmente, las ciclodextrina-gluciltransferasas degradan el almidón por reacciones de catalización, ciclación y desproporción.

## 1.8 Maíz

El maíz (*Zea mays*) es el cereal de mayor consumo en México y en general en toda Latinoamérica de donde es originario.

### 1.8.1 Composición del maíz

En la Tabla 1.3 se muestra la composición química promedio para el grano de maíz; es un alimento con bajo contenido de proteína pero alto en hidratos de carbono, por lo que lo convierte en una de las principales fuentes de energía.

Tabla 1.3. Análisis químico proximal del grano de maíz

|               | Proteína | Lípidos | Fibra | Humedad | ELN* |
|---------------|----------|---------|-------|---------|------|
| Maíz blanco   | 7.9      | 4.7     | 12.2  | 10.6    | 73.0 |
| Maíz amarillo | 8.3      | 4.8     | 12.2  | 13.8    | 69.6 |

Fuente: Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", 1996.

Datos en base húmeda por 100 gramos.

\*Extracto libre de nitrógeno (hidratos de carbono).







Los hidratos de carbono del maíz están distribuidos entre muchos tejidos del grano. La Tabla 1.4 muestra los diferentes tipos de hidratos de carbono presentes en el maíz. El hidrato de carbono más abundante en el grano es el almidón y constituye entre 61 y 78% de su peso seco. Las variedades habituales de maíz en el comercio tienen un máximo de 65% de amilasa (Fennema, 1993).

Tabla 1.4. Principales hidratos de carbono del grano de maíz en peso seco (Boyer y Shannon, 1987)

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Monosacáridos              | Glucosa y fructosa (1-3%)   |
| Disacáridos y trisacáridos | Sacarosa (4-8%), maltosa (0.4%), rafinosa, maltotriosa                |
| Azúcar- alcohol            | Sorbitol, fitato (0.9%)   |
| Polisacáridos              | Almidón (61-78%), hemicelulosa (6-7%), celulosa (3%) y lignina (0.2%) |

Muchos polisacáridos diferentes juegan un papel importante en la estructura de los granos de maíz, éstos pueden clasificarse como sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosas. El pericarpio del maíz está compuesto de 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina con base en peso seco. Las pentosas xilosa y arabinosa son constituyentes muy importantes de los xilanos de la pared celular, los cuales constituyen de 90 a 95% de la hemicelulosa de la semilla de maíz. La hemicelulosa del pericarpio de maíz contiene 54% de Xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucurónico (Boyer, 1987).

Cravioto *et al.* (1955) analizaron el pozol y los granos de maíz utilizados en su preparación y encontraron que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptófano que el maíz. La concentración de proteína es mayor y ésta es de mejor calidad en el pozol que en el maíz. Ramírez (1987) detectó un aumento en las concentraciones de lisina, triptófano y niacina después de diez días de fermentación.

Según lo establecido por Flores Espinoza (1996), las bacterias lácticas aisladas del pozol son capaces de fermentar una gran cantidad de azúcares, incluyendo los que se encuentran en el nixtamal. Son capaces de degradar el almidón y su actividad amilolítica se ve favorecida en presencia de calcio. También se señala





---

que dichas bacterias poseen una propiedad importante que es la de hidrolizar un polímero de pentosas, el xilano, lo que sugiere que también podrían utilizar la hemicelulosa del maíz.

## **1.9 Almidón**

El almidón es un glucano compuesto por dos polímeros principales, amilopectina y amilosa, y se encuentra en forma de partículas llamadas gránulos. Es una de las formas naturales de almacenar energía para el crecimiento y reproducción de especies de plantas. Comúnmente los almidones alimenticios se obtienen de semillas, leguminosas, tubérculos, raíces, tallos y polen de plantas superiores. Algunas frutas también contienen cantidades significativas de almidón que es convertido en azúcar durante su maduración. El almidón es parte fundamental de la dieta del hombre (Belitz y Grosh, 1999). La morfología de los gránulos de almidón ha sido estudiada usando microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

### **1.9.1 Estructura del almidón**

El 60% aproximadamente de la masa de un gránulo de almidón se considera cristalino y el 30% aproximadamente amorfo. En las zonas amorfas se localiza la mayor parte de amilosa, aunque también una fracción considerable de amilopectina. Las zonas cristalinas están formadas predominantemente por amilopectina, debido a su estructura ramificada, mientras que la amilosa por ser de estructura lineal puede disolverse fácilmente de la fracción cristalina del gránulo de almidón (Belitz y Grosh 1999).





### 1.9.2 Amilosa

La amilosa está constituida por cadenas lineales de 200-2500 unidades y pesos moleculares de hasta un millón de Daltons unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) (Fennema, 1993). Es un polímero de glucosa que puede adoptar conformaciones helicoidales. El contenido de amilosa varía con la fuente botánica del almidón pero comúnmente es de 20 a 30% para almidones de cereales. Es generalmente insoluble o poco soluble en agua y solo se disuelve mediante el uso de condiciones más o menos drásticas. Se han desarrollado variedades de cereales denominadas de alta amilosa las cuales contienen de 40 a 70%. Por otro lado, el almidón de ciertas variedades de maíz, avena y arroz llamadas cerasas o cerosas no contienen cantidades apreciables de amilosa (0-3%) (Hood, 1992).

### 1.9.3 Amilopectina

La amilopectina tiene un peso molecular muy alto, algunas fracciones llegan a alcanzar pesos de  $10^6$  hasta  $10^9$  Da (Colonna *et al.*, 1981), estas fracciones se encuentran unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) (Fennema, 1993). Es un polímero altamente ramificado en el cual las ramificaciones ocurren cada 15 a 25 unidades lineales de glucosa. Como polisacárido ramificado, es más soluble que los lineales puesto que disminuyen las interacciones entre cadenas y facilita, por tanto, la solvatación. Las disoluciones de estos polisacáridos tienen una viscosidad menor que las de los lineales. La amilopectina, por el calentamiento en agua, forma soluciones claras y de alta viscosidad que son además filamentosas y cohesivas (Hulleman *et al.*, 1998). No tiene casi tendencia a la retrogradación, ni presenta envejecimiento, ni forma geles, aunque la concentración sea muy alta. Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades sensoriales y reológicas de los almidones, principalmente en su capacidad de hidratación, gelatinización y gelificación.





---

La estructura rígida de los gránulos está integrada por capas concéntricas de amilosa y de amilopectina distribuidas radialmente que permanecen inalterables durante la molienda, el procesamiento y la obtención de los almidones comerciales.

#### **1.9.4 Gelatinización**

Los gránulos de almidón intactos no son solubles en agua fría pero pueden embeber pequeñas cantidades de agua de forma reversible ocasionando un pequeño hinchamiento y volver luego al tamaño original al secarse. Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura, las moléculas de almidón vibran vigorosamente rompiendo los enlaces intermoleculares, permitiendo así la formación de puentes de hidrógeno con el agua. La penetración de agua, así como la penetración progresiva de más y de mayores segmentos de cadenas de almidón, aumenta el azar en la estructura general y disminuye el número y el tamaño de las regiones cristalinas, gelatinizando primero los gránulos más grandes y por último los pequeños, obteniéndose una pasta viscosa en la que casi toda el agua ha penetrado en los gránulos. Con el hinchamiento, los gránulos ejercen una fuerte presión unos contra otros a modo de celdillas de panal.

Estos cambios tienen lugar en el almidón de trigo entre 52 y 60 °C. Si la temperatura sigue aumentando continuamente, el gránulo termina colapsándose y rompiéndose. El grado de hidratación depende de la temperatura, el pH, la concentración y la fuerza cizallante aplicada (Wong, 1989).

A medida que se incrementa la temperatura se retiene más agua, el gránulo empieza a hincharse y a aumentar de volumen, fenómeno que puede observarse en el microscopio, todos estos cambios ocurren sin que se presente un aumento importante en la viscosidad. Una vez que la parte amorfa se ha hidratado completamente la cristalina inicia un proceso semejante, pero para esto se requiere más energía (Badui, 2006) (Figura 1.1).



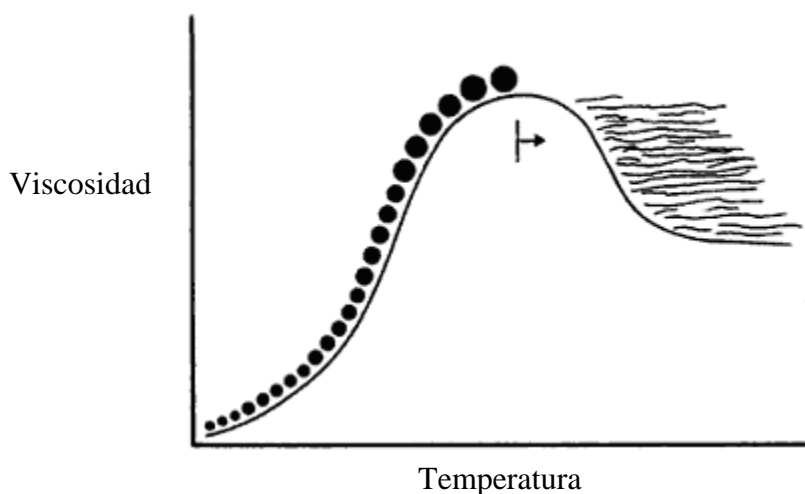


Figura 1.1. Gelatinización del almidón. Los gránulos se hinchan y retienen un máximo de agua hasta que se rompen y producen una dispersión de moléculas de amilosa y amilopectina (Wong, 1989).

Las moléculas de amilosa, que son lineales y menos voluminosas que las ramificadas de amilopectina, pueden, en la fase inicial del proceso de gelatinización, difundir hacia y a través de la membrana superficial y pasar así a la solución extragranular (Fennema, 1993).

La temperatura de gelatinización es aquella en la que se alcanza el máximo de viscosidad y se pierde la birrefringencia y el patrón de difracción de rayos X; ésta temperatura es en realidad un intervalo, ya que los gránulos tienen diferente composición y grado de cristalinidad, aunque provengan de la misma fuente botánica, lo que provoca que unos sean más resistentes que otros (Badui, 2006).

La gelatinización modifica la viscosidad de las dispersiones de almidón, y las características de los geles formados dependen no solamente de la temperatura sino también de los tipos y cantidades de los demás constituyentes igualmente presentes. En muchos casos, el almidón se encuentra acompañado de azúcares, proteínas, grasa, ácidos y agua. La actividad de agua está influenciada por las sales, azúcares y otros agentes que retienen agua. Así, si alguno de estos constituyentes se encuentra presente, la actividad de agua será baja y la gelatinización no se producirá o se verá retardada (Hall *et al.*, 2000).





Debido al carácter neutro del almidón, las bajas concentraciones de sales ejercen solo un pequeño efecto sobre la gelatinización. La velocidad de hinchamiento del almidón se incrementa grandemente a pH 10; a bajo pH se produce una marcada reducción del máximo de viscosidad de pastas de almidón. A pH muy bajo ocurre la hidrólisis del almidón apareciendo dextrinas, que son poco espesantes (Fennema, 1993).

Los cambios que se producen en las propiedades reológicas se deben al esponjamiento de los gránulos de almidón y a la salida de los polímeros de almidón desde los gránulos. Los gránulos de almidón captan agua y se hinchan hasta varias veces su tamaño original gracias a la pérdida de cristalinidad que produce un cambio en la estructura del almidón.

Los análisis reológicos de preparaciones acuosas de almidón han señalado que analizando dos concentraciones diferentes se puede mostrar la conducta del proceso de gelatinización. En los sistemas diluidos la viscosidad está determinada por el volumen de los gránulos hinchados, mientras que en preparaciones concentradas está influenciada por la rigidez de las partículas (Dendy, 2001).

### **1.9.5 Gelificación y Retrogradación**

El término retrogradación se utiliza para describir los cambios que se producen en un gel de almidón después del calentamiento, durante el enfriamiento y el consiguiente almacenamiento (Dendy, 2001). Se define como la pérdida de solubilidad y la precipitación espontánea del almidón, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente y unen entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidroxilos (Belitz, 1992). Se cree que los cambios reológicos iniciales que acompañan a la gelificación del almidón son resultado de la gelificación de la matriz de amilosa. Resultados de estudios sugieren que la gelificación, o las primeras etapas de la retrogradación, aparecen con la separación de fase seguida





---

de una cristalización lenta en la fase rica del polímero, constituida principalmente por amilosa (Miles *et al.*, 1984).

El enfriamiento de una pasta de almidón caliente da lugar generalmente a la formación de un gel viscoelástico, firme y rígido. El desarrollo de las zonas de asociación en un gel puede ser considerado como la primera fase del inicio de la cristalización por parte de las moléculas de almidón (Fennema, 1993). Al calentar a 60-70 °C una dispersión acuosa de almidón se forma una suspensión con partículas hinchadas, compuestas por amilopectina, y una fase continua compuesta por amilosa. Al enfriarse, la pasta de almidón forma un gel compuesto por la fase continua, el cual surge con la gelificación de la amilosa principalmente. Este proceso también es referido como retrogradación de la amilosa y es de primordial importancia en la determinación de las propiedades de textura de alimentos ricos en almidón (Doublier *et al.* 1989).

La velocidad de retrogradación depende de diversas variables, entre las que se encuentran: la relación molecular amilosa/amilopectina, la temperatura, la concentración de almidón y la presencia y concentración de otros ingredientes, como surfactantes y sales (Fennema, 1993).

### **1.10 Reología**

La reología se define como la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia. Es una rama de la física relacionada con la mecánica de la deformación de los cuerpos. La utilización de la reología en el análisis y caracterización del comportamiento de productos alimenticios cuando se les aplica una fuerza es relativamente reciente; para alimentos líquidos se inicia en 1960, y los primeros estudios sobre reología de sólidos son posteriores a 1970. Algunas de las principales causas de esta demora son la variedad y complejidad en la composición y estructura de los alimentos, la dificultad en adaptar y utilizar ecuaciones matemáticas para explicar diferentes comportamientos reológicos. La reología moderna además de los comportamientos elástico y viscoso, estudia





también sistemas complejos que presentan simultáneamente propiedades elásticas y viscosas, es decir, sustancias viscoelásticas. Un estudio reológico bien fundamentado es aquel que permite obtener funciones materiales de flujo estacionario y no estacionario a partir de una relación bien definida entre el esfuerzo y la deformación o la velocidad de deformación (Muller, 1973).

### 1.10.1 Tensión y esfuerzo

La tensión es la capacidad del material de estirarse, mientras que el esfuerzo se define como la fuerza por unidad de área expresada generalmente en pascales. Todo material se deforma ante un esfuerzo y llega a un límite. Dependiendo de cómo se perturbe el material es cómo va responder. Existe el esfuerzo normal y de cizalla, también conocido como esfuerzo de corte. Dentro del esfuerzo normal se encuentra la compresión y la extensión, mientras que en el esfuerzo de cizalla se aplica de manera circular o rectilínea (Muller, 1973).

### 1.10.2 Deformación

La deformación se define como el cambio de forma de algún sistema.

Un módulo es la relación entre el esfuerzo y la deformación:

$$\text{módulo} = \frac{\text{esfuerzo}}{\text{deformación}}$$

En una representación gráfica del esfuerzo y la deformación, o del esfuerzo y la velocidad de deformación, en régimen de oscilación armónica simple, existen los módulos  $G'$  y  $G''$ . Donde  $G'$  es el módulo de almacenamiento (respuesta elástica) y  $G''$  el módulo de pérdida (respuesta viscosa) (Muller, 1973).







### 1.10.3 Viscosidad y elasticidad

La viscosidad es la oposición de un fluido a las deformaciones tangenciales. Un fluido que no tiene viscosidad se llama fluido ideal, en realidad todos los fluidos conocidos tienen viscosidad, siendo el modelo de viscosidad nula una aproximación bastante buena para ciertas aplicaciones. Como medida de la fricción interna, actúa como resistencia contra la modificación de la posición de las moléculas al actuar sobre ellas una tensión de cizallamiento. La viscosidad es una propiedad que depende de la presión y la temperatura, y se define como el cociente resultante de la división de la tensión de cizallamiento ( $\sigma$ ) por el gradiente de velocidad ( $\Delta$ ):

$$\mu = \sigma / \Delta$$

Sus unidades en el Sistema Internacional son  $\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$

La elasticidad es estudiada por la teoría de la elasticidad. La teoría de la elasticidad describe cómo un sólido se mueve y se deforma como respuesta a fuerzas exteriores. La propiedad elástica de los materiales está relacionada con la capacidad de un sólido de sufrir transformaciones termodinámicas reversibles. Cuando sobre un sólido deformable actúan fuerzas exteriores y éste se deforma, se produce un trabajo de estas fuerzas que se almacena en el cuerpo en forma de energía potencial elástica y por lo tanto se producirá un aumento de la energía interna. El sólido se comporta elásticamente si este incremento de energía puede realizarse de forma reversible, en este caso decimos que el sólido es elástico. La tangente delta ( $\tan \delta$ ) es el cociente de la viscosidad y la elasticidad. Si los valores de tangente delta tienden a cero predomina el carácter elástico en el sistema en estudio y si los valores tienden a infinito predomina el carácter viscoso (Muller, 1973).

$$\tan \delta = G'' / G'$$





---

#### 1.10.4 Viscoelasticidad

La viscoelasticidad estudia las propiedades viscosas y elásticas de un material y éstas se determinan normalmente aplicando una perturbación oscilatoria. Dentro de las pruebas oscilatorias se encuentra el barrido de deformación y el barrido de frecuencia.

Tanto en los geles de amilosa y amilopectina como en los geles de almidón se ha observado un aumento en el módulo elástico ( $G'$ ) con el tiempo de almacenamiento (Dendy, 2001). En la evolución del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo de pérdida ( $G''$ ) primero participa un periodo de inducción (5-600 min., dependiendo de la concentración de amilosa) donde el medio permanece sin turbidez y no hay variación de  $G'$  y  $G''$  con respecto al tiempo. Después de esto se presenta un continuo incremento de  $G'$  y un ligero incremento de  $G''$  (Doublier *et al.* 1989).

La modificación en el peso molecular de una macromolécula, como ocurre durante la hidrólisis enzimática del almidón, afecta sensiblemente su comportamiento viscoelástico y por lo tanto, la reología es una herramienta muy útil en el seguimiento de esa modificación que ocurre con el tiempo (Muller, 1973). Por ello, en este trabajo se plantea su uso para darle seguimiento a los cambios ocurridos en el almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.





---

## CAPÍTULO 2

### Metodología

#### 2.1 Estrategia experimental

La Figura 2.1 muestra el esquema general de la fase experimental. Se ensayó una sola condición de fermentación a 30 °C por un período de 7 días usando masa preparada con harina de maíz nixtamalizado de la marca MASECA. La masa preparada previamente esterilizada fue inoculada con una cepa pura de *L. plantarum* A6 (para masas inoculadas) y con disolución salina estéril (para masas control). Se realizaron tres repeticiones, tanto de la masa inoculada como de la control. En cada repetición se utilizó la misma masa preparada y el mismo lote de inóculo.

Se determinaron las cuentas viables de cada cepa en medio ACP (Agar Cuenta en Placa), MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y MRS-A (Man, Rogosa y Sharpe - Almidón), al igual que pH, acidez, humedad, azúcares reductores, almidón residual y las propiedades viscoelásticas en régimen de cizalla oscilatoria de baja amplitud, que incluyó barridos de deformación a una frecuencia de 6.28 rad/s y barridos de frecuencia a una deformación constante desde  $10^{-1}$  hasta  $10^2$  rad/s. Todas estas determinaciones tuvieron que realizarse en tres fermentaciones distintas pero con las mismas condiciones, pues no fue posible realizar todas las determinaciones en un mismo día.



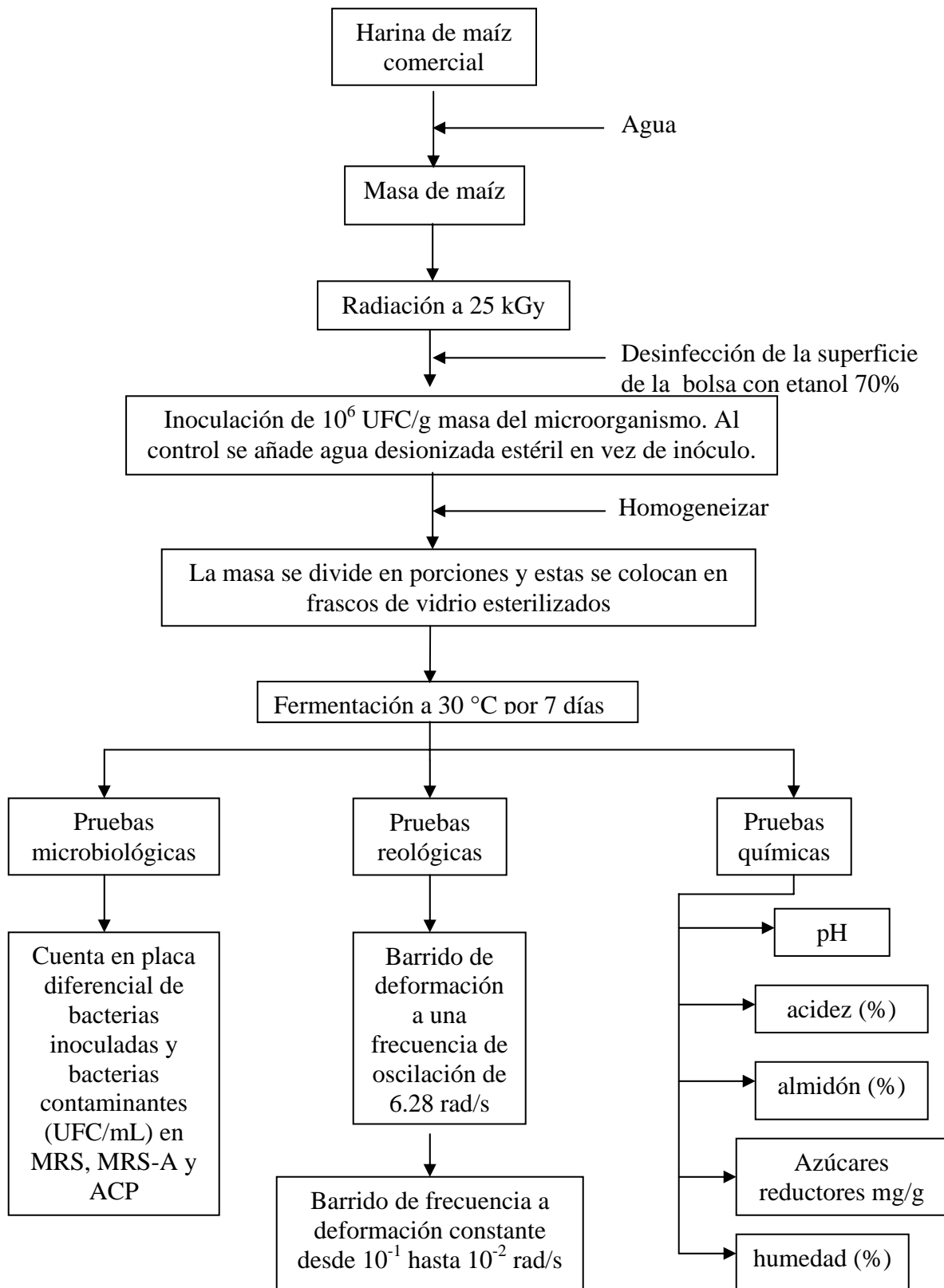


Figura 2.1. Diagrama general de trabajo experimental.





---

## 2.2 Microbiología

La masa preparada con harina MASECA se inoculó con *Lactobacillus plantarum* A6, un microorganismo amilolítico.

### 2.2.1 Preparación del inóculo

La cepa de *L. plantarum* A6 fue proporcionada por el Doctor Jean-Pierre Guyot y se encontraba conservada en congelación a -70 °C en glicerol al 20% en microtubos en el laboratorio 324 del Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM a cargo de la Dra. Carmen Wacher.

Bajo campana de flujo laminar se agregaron 0.3 mL de inóculo de *L. plantarum* A6 en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo MRS. El tubo se homogeneizó con un vortex (Genie 2, Fisher Scientific) y se incubó por 24 h a 30 °C (VWR-1550, VWR Scientific Inc.). Posteriormente del tubo se tomó con micropipeta (Loppete, Labnet International, Inc.) 0.3 mL de cultivo y se inocularon en 10 mL de caldo MRS; la suspensión fue incubada por 18 horas a 30 °C. Con el objetivo de reactivar al microorganismo, consecutivamente se tomaron 0.3 mL y se volvieron a inocular en 10 mL de caldo MRS, después se incubaron 18 horas a 30 °C.

Se realizó aislamiento de colonias y una tinción de gram para verificar la pureza de la cepa, y cuenta en placa para determinar la cantidad de UFC contenidas en la suspensión.

### 2.2.2 Aislamiento y tinción de gram

En agar MRS se inoculó *L. plantarum* A6 por estriado y se incubó por 24 horas a 30 °C. Se determinó la pureza de la cepa comprobando homogeneidad entre las colonias, es decir, que todas las colonias presentaran las características representativas de este microorganismo: colonias lisas, convexas, color blanco-beige de 2-3 mm de diámetro.





Además, para confirmar que las células efectivamente eran de *L. plantarum* A6 se realizó una tinción de gram de una colonia aislada con lo que se comprobó la morfología bacilar y un gram positivo propios, Para esto, en la campana de flujo laminar y con mechero encendido, se tomó con un asa estéril una colonia aislada del microorganismo, se frotó en un portaobjetos y se fijó pasando el portaobjetos por la llama de un mechero. Se cubrió la preparación ya fija con cristal violeta de gram y se dejó actuar durante un minuto moviendo suavemente el portaobjetos para favorecer el contacto del colorante con las células. Al cabo de un minuto se escurrió el exceso de colorante y se enjuagó. Se cubrió la preparación con lugol de gram, se dejó actuar durante un minuto, se escurrió el exceso y se lavó. La preparación se decoloró agregándole una mezcla 70:30 de alcohol-acetona. Tan pronto como las gotas de esta mezcla ya no arrastraron color, se lavó con agua para detener la acción del colorante, se escurrió el exceso y se dejó secar al aire. Finalmente se cubrió la preparación con safranina durante un minuto, se escurrió el exceso y se enjuagó. Después se observó al microscopio (CX40 Olympus) con el objetivo 100x.

### **2.2.3 Cuenta en placa**

Del cultivo en caldo MRS se tomaron 0.3 mL con micropipeta, se colocaron en 10 mL de caldo MRS y se incubaron 18 horas a 30 °C. Se hicieron diluciones agregando 0.5 mL de la suspensión de concentración anterior en 4.5 mL de agua peptonada al 1%, hasta llegar a  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  UFC/mL por duplicado y se llevó a cabo cuenta en placa en medio MRS en condiciones asépticas. Para esto, se tomó 0.1 mL y se inoculó en el medio y se esparció con una varilla metálica previamente flameada y enfriada.





---

## 2.3 Acondicionamiento de la masa para la fermentación

### 2.3.1 Preparación de la masa

Se utilizó harina de maíz nixtamalizado de marca MASECA comprada en una tienda de autoservicio. Para cada fermentación realizada se utilizó un lote diferente de harina pero el mismo para todas las replicas.

Para preparar la masa se ocupó la harina directamente del empaque sin realizarle ningún tipo de control.

Se pesó la cantidad necesaria de harina para hacer todas las determinaciones y se colocó en una charola, se le agregó el agua necesaria para ajustar la humedad a 36%, se amasó dentro de la misma charola para distribuir de forma homogénea el agua. Después la masa se dividió en porciones iguales las cuales fueron colocadas en 6 bolsas de plástico con cierre hermético, se aplanaron hasta un espesor aproximado de 2 cm para expulsar la mayor cantidad de aire de la bolsa y disminuir la cantidad de oxígeno, por último las bolsas fueron cerradas. Posteriormente las bolsas fueron esterilizadas por medio de radiación gamma de 25 kGy durante 7 h en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Una vez irradiadas, las bolsas estuvieron en refrigeración a 4 °C por 3 días hasta el momento de su inoculación.

### 2.3.2 Inoculación

Se desinfectó con etanol al 70% la superficie de la bolsa de plástico que contenía la masa estéril y se abrió dentro de la campana de flujo laminar. A tres bolsas se les añadió el volumen necesario del inóculo resuspendido en agua desionizada estéril para obtener  $10^6$  UFC/g de masa húmeda del microorganismo. Al resto se les agregó el mismo volumen pero de agua estéril para ser considerados como masas control Se amasó dentro de la bolsa, con movimientos que empujaban la masa de la orilla hacia el centro, para homogeneizar.





---

### 2.3.3 Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en frascos de vidrio previamente esterilizados en autoclave (Presto, Industriales Steele) a 121 °C durante 15 minutos con cubierta de papel de aluminio sujetado con una liga. La masa de cada bolsa se dividió en porciones iguales de aproximadamente 100 g cada una. La masa permaneció dentro de la bolsa de plástico mientras las divisiones se marcaban con una espátula sobre la bolsa. Cada porción se transfirió con una espátula estéril a un frasco, se compactó con la misma espátula de manera que no quedaron huecos visibles en la masa y ésta se cubrió con agar estéril para asegurar condiciones homogéneas de anaerobiosis. Los frascos se cubrieron con papel aluminio y ligas estériles y se incubaron a 30 °C. Todas las manipulaciones descritas previas a la inoculación se realizaron en campana de flujo laminar. En todos los casos se prepararon tres controles para cada tiempo de muestreo manipulados de la misma manera a los cuales se le añadió agua desionizada estéril en lugar de inóculo.

## 2.4 Análisis microbiológicos

### 2.4.1 Cuentas de bacterias viables

En todos los casos se tomó una muestra del centro de la masa con una espátula estéril. Se añadieron 10 g de muestra a 90 mL de peptona al 0.1% y se homogeneizaron en un Stomacher 400 (Seear, Laboratorios Blender) durante 1 minuto. Se hicieron diluciones decimales con el mismo diluyente tomando 0.5 mL de la muestra y colocándolos en 4.5 mL de agua peptonada y se homogenizaron con vortex.

Se realizaron cuentas en placa de la bacteria inoculada utilizando tres medios de cultivo: MRS (crecimiento de bacterias lácticas), MRS-A (crecimiento de bacterias lácticas amilolíticas) y ACP (bacterias mesófilas aerobias) (APÉNDICE 1) para comprobar que no hubo contaminación, pues dos de los éstos son selectivos. Para







cada medio se colocaron por duplicado 0.1 mL de las tres diluciones adecuadas de las masas inoculadas y control, respectivamente, en cajas Petri, esparciéndolas con una varilla metálica esterilizada y se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Se observó y cuantificó el crecimiento microbiano.

#### **2.4.2 Cuenta de bacterias contaminantes**

En las mismas cajas Petri se realizaron cuentas separadas de:

1. Colonias mayores de 1 mm de diámetro (bacterias contaminantes)
2. Colonias con diámetro menor o igual a 1 mm cuya muestra representativa resultara catalasa negativa. Se contaron estas colonias, presumiblemente de bacterias lácticas.

#### **2.5 Determinaciones reológicas**

A cada porción de masa se le hicieron dos pruebas reológicas en placas paralelas estriadas de acero inoxidable de 25 mm de diámetro: Barrido de deformación a una frecuencia de oscilación de 6.28 rad/s y barrido de frecuencia a una deformación constante desde  $10^{-1}$  hasta  $10^2$  rad/s. Las pruebas se llevaron a cabo en un reómetro de deformación controlada (ARES-RFSIII TA Instruments, USA).

##### **2.5.1 Barrido de deformación**

Se colocó una porción de masa de aproximadamente 2 g entre las placas separadas por 3 mm y se llevó a cabo el barrido de deformación a una frecuencia de oscilación de 6.28 rad/s con el propósito de definir la zona de dependencia lineal entre el esfuerzo y la deformación.





---

## 2.5.2 Barrido de frecuencia

Se colocó una porción de masa de aproximadamente 2 g entre las placas y se llevó a cabo el barrido de frecuencia desde  $10^{-1}$  hasta  $10^2$  rad/s a una deformación constante determinada previamente para cada muestra, con el propósito de examinar el comportamiento de los módulos dinámicos  $G'$  y  $G''$  de la masa de maíz durante la fermentación.

## 2.6 Análisis químicos

### 2.6.1 pH

Técnica descrita por la AOAC (1990).

Se colocaron 5 g de la masa de maíz en 10 mL agua desionizada y se homogeneizó. La medición de pH se llevó a cabo con un potenciómetro de electrodo de vidrio (Orión 420A) previamente calibrado con buffers de pH 4 y pH 7.

### 2.6.2 Contenido de ácido láctico

Técnica descrita por la AOAC (1990).

Se pesaron aproximadamente 10 g de cada muestra y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se llevaron a 100 mL con agua y se agitó vigorosamente hasta homogeneizar; posteriormente se tituló con una disolución de NaOH 0.1 N usando como indicador 2 mL de fenolftaleína en disolución alcohólica al 1%; la disolución se agregó hasta que el punto de viraje a rosa tenue persistió por 15 segundos. El contenido de ácido láctico en porcentaje, se calculó mediante la siguiente ecuación:

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





---

### 2.6.3 Contenido de humedad

Técnica descrita por la AOAC (1990).

Se colocaron charolas de aluminio en una estufa (Aparatos de laboratorio BG; Horno HCF-45) a 100 °C hasta peso constante. Se pesaron 2 g de muestra y se secaron a la misma temperatura hasta obtener peso constante. Las charolas con las muestras se trasladaron en un desecador y se manipularon con pinzas metálicas. El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso.

### 2.6.4 Azúcares reductores

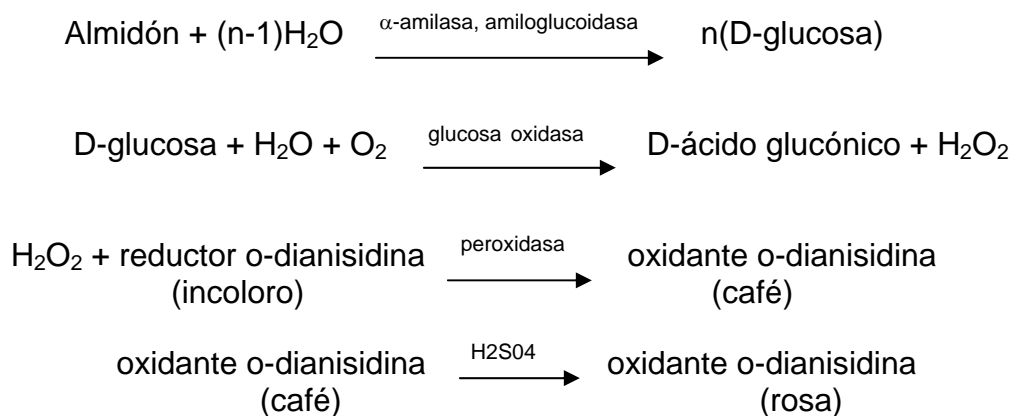
Técnica descrita por la AOAC (1990).

Se colocaron 10 g de masa de maíz en 90 mL de agua destilada y se homogeneizó con un stomacher a velocidad normal durante 60 s. Se filtró y se aforó a 100 mL con agua destilada. Con una pipeta de vidrio se tomó 1 mL de la disolución acuosa de la muestra y se le adicionó 1 mL del reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS; APÉNDICE 1). Se calentó por 5 min en un baño de agua en ebullición. Se enfrió y diluyó con 10 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia del color producido a 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10uv) contra un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra. Los azúcares reductores se cuantificaron por referencia a una curva patrón preparada con glucosa en el intervalo de concentraciones de 0 a 0.2 mg/mL. La curva patrón se construyó con las absorbancias a 540 nm obtenidas a partir de una solución stock de glucosa de 1 mg/mL (APÉNDICE 1)

### 2.6.5 Contenido de almidón

Para determinar la cantidad de almidón que no fue hidrolizado durante la fermentación se utilizó el kit STA20 (Sigma-Aldrich, México) o método amilasa/amilogucosidasa (APÉNDICE 3) basado en las siguientes reacciones:





La hidrólisis de almidón a glucosa es catalizada por la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa. La glucosa se oxida a ácido glucónico y agua oxigenada por la glucosa oxidasa. El agua oxigenada reacciona con la o-dianisidina en presencia de peroxidasa formando un complejo colorido. La o-dianisidina reacciona con ácido sulfúrico formando un compuesto colorido más estable. La intensidad del color rosa medido a 540 nm es proporcional a la concentración original de glucosa. Cabe mencionar que este método cuantifica el almidón total sin importar el tamaño de las cadenas.

### 2.6.5.1 Preparación de la muestra

Cada muestra se secó por cuatro horas en una estufa a 100 °C, una vez seca se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino.

En tubos para centrífuga apropiadamente marcados, se colocaron de 5 a 10 mg de cada muestra. Por contener la muestra azúcares reductores fue necesario hacer una extracción con etanol para remover estas sustancias de la siguiente manera:

Se añadieron 5 mL de una disolución de etanol al 80% en cada tubo, se incubaron a 80-85 °C por 5 minutos en un baño de agua (Brookfield 02072, USA), posteriormente se mezcló el contenido de los tubos y se añadieron otros 5 mL de la disolución de etanol. Los tubos se centrifugaron (Labnet HermLe Z 200A) por 10





minutos a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la muestra en 10 mL de disolución de etanol y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante.

Se adicionaron 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada muestra, se mezclaron e incubaron por cinco minutos en un baño de agua en ebullición y se procedió con la digestión de almidón.

### 2.6.5.2 Digestión de almidón

Se adicionaron 0.2 mL de etanol al 80% a cada muestra y también a un tubo sin muestra (blanco de la digestión de almidón). Se agregaron con pipeta 3.0 mL de agua y 0.02 mL de  $\alpha$ -amilasa a cada muestra y al tubo con el blanco, se mezclaron e incubaron por 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se llevó el volumen de cada tubo a 10 mL y se mezcló. A 1.0 mL de cada muestra del paso anterior y del blanco se les añadió 1.0 mL de Starch Assay Reagent (amiloglucosidasa), se mezclaron e incubaron por 15 minutos en un baño de agua a 60 °C. Se llevaron a temperatura ambiente, se diluyó 1.0 mL de cada muestra y el blanco a 10 mL con agua desionizada y se procedió con la determinación de glucosa.

### 2.6.5.3 Determinación de glucosa

Se prepararon con pipeta las siguientes disoluciones (Tabla 2.1) en tubos de ensayo apropiadamente marcados.

Tabla 2.1. Preparación de tubos para determinación de glucosa.

| Reactivo  | Blanco estándar | Estándar | Blanco reactivo | Muestra |
|---|-----------------|----------|-----------------|---------|
| Agua (mL)   | 1.0             | 0.950    | ----            | ----    |
| Reactivo estándar glucosa, D-glucosa 1.0 mg/mL en 0.1% de ácido benzoico (mL) | ----            | 0.05     | ----            | ----    |
| Blanco de la digestión de almidón (mL)  | ----            | ----     | 1.0             | ----    |
| Muestra de la digestión almidón (mL)  | ----            | ----     | ----            | 1.0     |





---

La reacción comenzó adicionando 2.0 mL de Glucose Assay Reagent (o-dianisidina, glucosa oxidasa/peroxidasa) al primer tubo y se mezcló. En intervalos de 30 segundos se adicionó Glucose Assay Reagent a los tubos subsecuentes. Cada tubo se incubó exactamente 30 minutos a 37 °C en un baño de agua. La reacción se detuvo en intervalos de 30 segundos adicionando 2.0 mL de ácido sulfúrico 12 N (APÉNDICE 1) a cada tubo y mezclando perfectamente. Se midió la absorbancia de cada tubo a 540 nm.

## **2.7 Análisis estadístico**

Para cada día de fermentación se realizaron tres repeticiones tanto de las masas inoculadas como de las control para obtener el valor de la desviación estándar y el coeficiente de variación y con esto comprobar la precisión de los resultados obtenidos para cada día y así asegurar su confiabilidad.

A los resultados obtenidos de las determinaciones del contenido de almidón y las pruebas reológicas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existió variabilidad de estos parámetros durante cada día del tiempo de fermentación (APÉNDICE 2).





---

## CAPÍTULO 3

### Resultados y discusión

La parte experimental se llevó a cabo en tres fermentaciones bajo las mismas condiciones. En la primera fermentación se realizaron las determinaciones reológicas barrido de deformación y barrido de frecuencia y el porcentaje de acidez y pH. Debido a que las mediciones reológicas tomaron un día para medir cada muestra y control con sus respectivas repeticiones, fue necesario hacer otras fermentaciones para las mediciones restantes.

En la segunda fermentación se hicieron las determinaciones microbiológicas: cuenta en placa en los medios MRS, MRS-A y ACP para determinar la pureza de la cepa y las determinaciones químicas: azúcares reductores, almidón y pH. La medición de pH se realizó en ambas fermentaciones para corroborar que se produjeran los mismos cambios en ambas y asegurar que las mediciones que se hicieron en la primera fermentación correspondan con la segunda aunque no fueran del mismo lote.

La determinación de almidón se realizó con la técnica enzimática del kit STA20 (Sigma-Aldrich, México) en una tercera fermentación. En esta misma, también se determinó nuevamente el comportamiento reológico para verificar la existencia de una relación entre el contenido de almidón con los cambios reológicos.

#### 3.1 Crecimiento microbiano

Durante los primeros 4 días de fermentación, el crecimiento de *L. plantarum* A6 fue acelerado, las poblaciones al inicio y al final de la fermentación en los respectivos medios empleados para la cuantificación de las colonias se muestran en la Figura 3.1. Debido a que este microorganismo es capaz de crecer en todos estos medios, puede notarse que la cuantificación en los tres medios fue muy similar (Tabla 3.1).



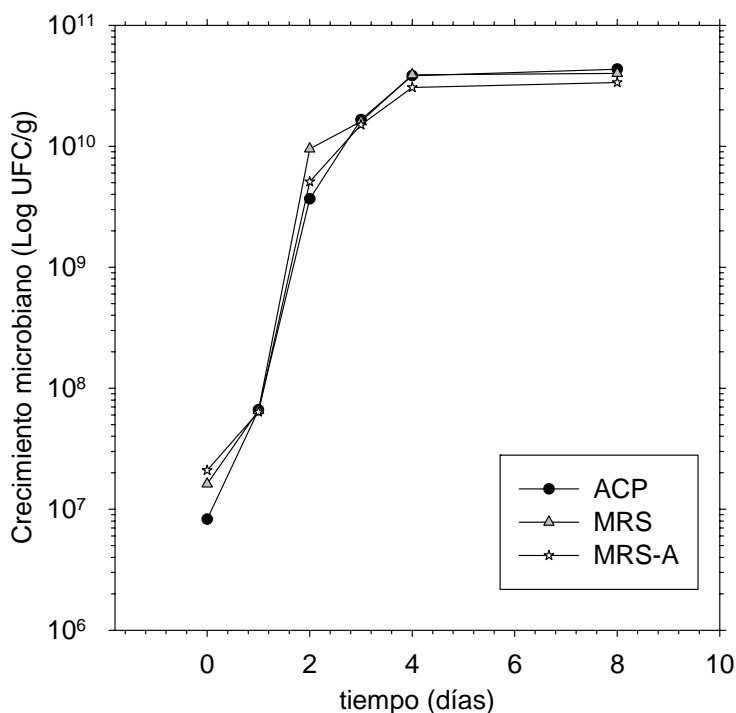


Figura 3.1. Crecimiento microbiano de *L. plantarum* A6 durante la fermentación a 30 °C de masa de maíz nixtamalizado en diferentes medios de cultivo.

Tabla 3.1. Cuenta en placa promedio en los tres medios empleados.

| UFC/g   | MRS                   | MRS-A                 | ACP                   |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Inicial | $8.25 \times 10^6$    | $1.62 \times 10^7$    | $2.10 \times 10^7$    |
| Final   | $4.30 \times 10^{10}$ | $4.00 \times 10^{10}$ | $3.36 \times 10^{10}$ |

Se utilizaron los medios MRS (crecimiento de bacterias lácticas), MRS-A (crecimiento de bacterias lácticas amilolíticas) y ACP (bacterias mesófilas aerobias) para corroborar la única presencia del microorganismo usado en este estudio, si en el medio ACP o MRS se hubiese encontrado un número superior de colonias que en el resto, esto indicaría la contaminación por otro tipo de microorganismos en nuestras muestras.

Se realizó a la par de la fermentación masas control por triplicado, inoculadas únicamente con agua estéril y manipuladas exactamente de la misma manera, a las cuales se les hicieron las mismas pruebas, químicas, reológicas y microbiológicas.







En las pruebas microbiológicas (conteo en placa), se confirmó la esterilidad de las masas control. Se determinó al igual que en las masas inoculadas a cada día de fermentación el crecimiento microbiano y no se observó presencia de microorganismos, lo que indica que no hubo contaminación en la masa. En algunos casos aislados se encontraron colonias contaminantes pero se atribuye la presencia de estas colonias a una contaminación en el momento de la inoculación de las diluciones en el agar y no de una contaminación de la masa. Este tipo de contaminación seguramente también se presentó en la determinación de las masas inoculadas, pero como el número de colonias provenientes de esta contaminación fue muy pequeño, una o dos colonias, y no es relevante frente a las encontradas del microorganismo en estudio, se puede despreciar este error.

### 3.2 pH

La Figura 3.2 muestra el cambio de pH durante ambas fermentaciones. Para las masas inoculadas el pH disminuyó desde  $6.33 \pm 0.065$  en la primera fermentación y de  $6.33 \pm 0.007$  para la segunda, hasta  $4.23 \pm 0.090$  y  $4.19 \pm 0.015$ , respectivamente. La bacteria es capaz de transformar hidratos de carbono de cadena corta en ácido láctico acidificando el medio en el que se desarrolla. El pH inicial, muy cercano a la neutralidad, favorece el crecimiento de la bacteria con una alta actividad amilolítica.

En las masas control el pH se mantuvo constante durante el tiempo de fermentación. El valor promedio de la primera fermentación fue de  $6.42 \pm 0.230$  con un C. V. de 3.59% y el de la segunda fermentación fue de  $6.32 \pm 0.174$  con un C. V. de 2.76%.



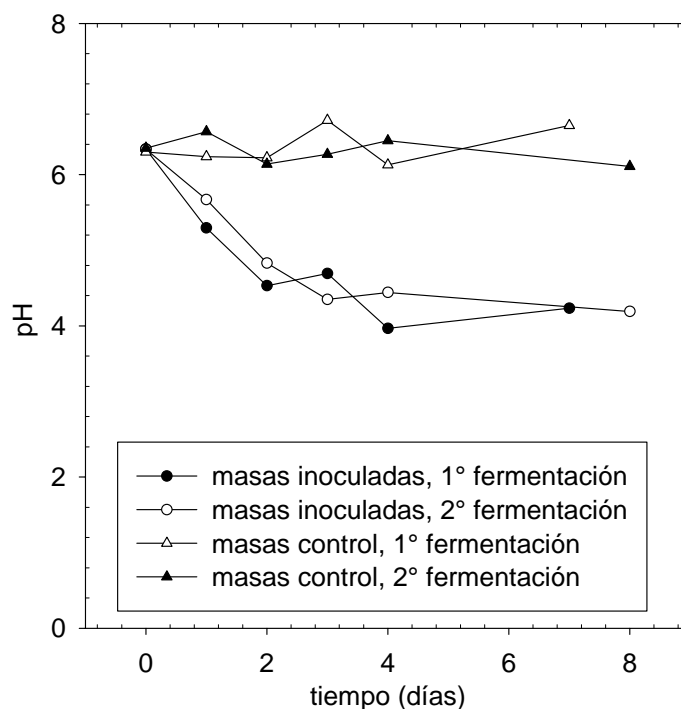


Figura 3.2. Variación de pH durante el tiempo de fermentación de las masas control e inoculadas con *L. plantarum* A6.

### 3.3 Porcentaje de ácido láctico

La concentración de este metabolito fue aumentando con los días de la fermentación; comenzando con  $0.113 \pm 0.003\%$  de ácido láctico y finalizando con  $0.900 \pm 0.005\%$ . En las masas control el contenido de ácido láctico no cambió con el tiempo por lo que se obtuvo un promedio del porcentaje de ácido láctico determinado cada día de la fermentación con un valor de  $0.130 \pm 0.011\%$  (Figura 3.3).

Los resultados obtenidos en las masas inoculadas se deben a que las bacterias lácticas, como lo es *L. plantarum* A6, oxidan los hidratos de carbono más sencillos produciendo, entre otros compuestos, ácido láctico principalmente, en otras palabras, conforme transcurre el tiempo de la fermentación el metabolismo de *L. plantarum* A6 utiliza los monosacáridos presentes en la masa convirtiéndolos en





ácido láctico como producto final. En las masas control es natural no observar cambios en el contenido de ácido láctico, debido a la ausencia de microorganismos que utilicen hidratos de carbono para producir este compuesto.

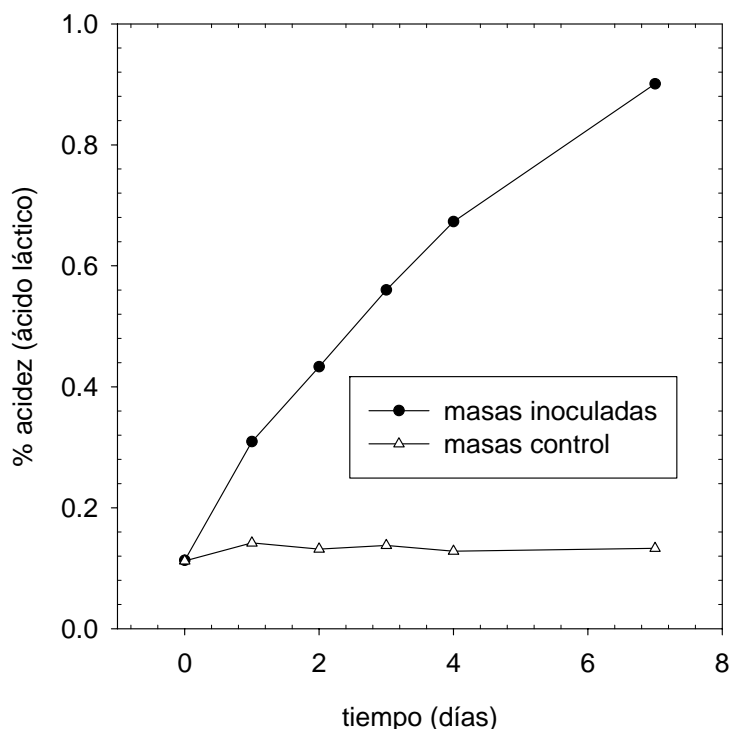


Figura 3.3. Variación del porcentaje de acidez durante el tiempo de fermentación de las masas control e inoculadas con *L. plantarum* A6.

La acidez inicial medida tanto en las masas control como en las masas inoculadas no fue cero debido a que posiblemente existía un ligero grado de rancidez en la harina, este fenómeno ocasionaría que los lípidos al degradarse generen ácidos grasos libres, provocando un aumento en la acidez inicial en la masa.

### 3.4 Humedad

El contenido de humedad se mantuvo constante durante los siete días de fermentación tanto en las masas control como en las masas fermentadas obteniéndose  $37.9 \pm 0.12\%$  con un coeficiente de variación de 0.33% para las





masas fermentadas y  $37.9 \pm 0.146\%$  con un coeficiente de variación de 0.39% para las masas control. Este comportamiento cumple con lo esperado ya que el contenido de humedad no se debería ver afectado debido a que los frascos permanecieron tapados herméticamente a lo largo del experimento.

De esta forma, también se puede descartar cualquier variación en el comportamiento reológico por cambios excesivos en la humedad de las masas conforme transcurrió la fermentación.

Por otro lado, el porcentaje de humedad determinado muestra que el medio ambiente para el crecimiento de las bacterias fue favorable en términos tanto del contenido de humedad como de la actividad acuosa.

### 3.5 Azúcares reductores

En la determinación de la concentración de azúcares reductores, para el caso de las masas control no hubo cambios considerables ya que fueron muy pequeños en comparación con los cambios en las masas inoculadas. El coeficiente de variación de las masas control muestra que sí hubo diferencia entre los resultados obtenidos para cada día del periodo de fermentación, lo cual no corresponde con lo esperado ya que, en principio, no se tiene actividad microbiológica que pueda producir algún cambio en la concentración de hidratos de carbono; sin embargo, los cambios producidos no son bruscos ni tan notorios como en el caso de las masas inoculadas lo que puede deberse a que, por el tipo de muestra, los componentes de la masa no están distribuidos de forma completamente homogénea o posiblemente a la presencia de enzimas endógenas del maíz.

El comportamiento de las masas inoculadas, que se observa en la Figura 3.4, indica que los azúcares reductores disminuyeron un poco el primer día, pero para el segundo día se observó un descenso muy notorio, mientras que al tercero y cuarto día se mantuvieron constantes. En el séptimo día la concentración de azúcares reductores aumentó de 3.5 a 7 mg/g, lo que se explica por la actividad metabólica de *L. plantarum* A6. La disminución observada en los primeros días es





debida a que el microorganismo utiliza primeramente los azúcares simples que están disponibles en la masa. Después de los días tres, cuatro y siete, la concentración de azúcares reductores aumentó, como era de esperarse, pues una vez que el microorganismo creció y consumió los hidratos de carbono más sencillos, comenzó a hidrolizar el almidón, generando con esto, un aumento en la concentración de azúcares reductores.

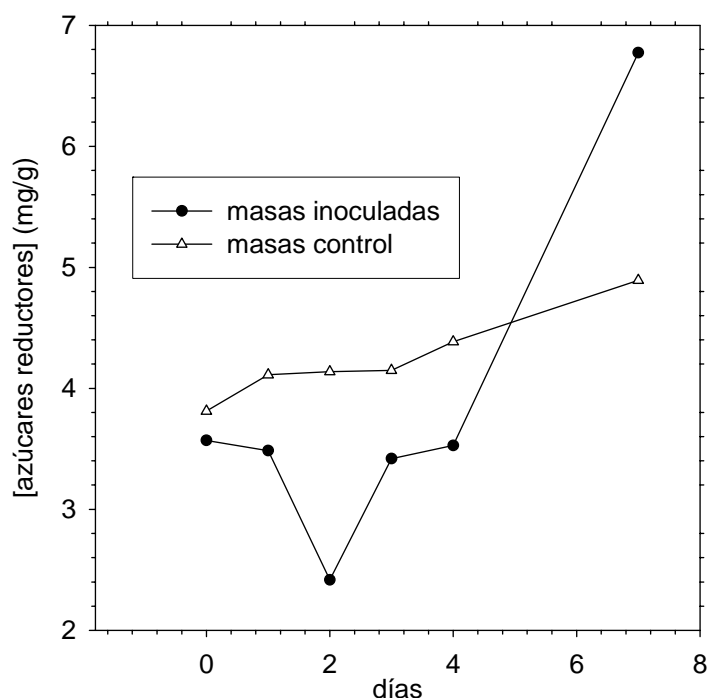


Figura 3.4 Variación de la concentración de azúcares reductores durante el tiempo de fermentación de las masas control e inoculadas con *L. plantarum* A6.

En el segundo día de la fermentación ocurrió un descenso importante en la concentración de azúcares reductores que puede ser asociado a que, en este mismo día, se presentó la mayor pendiente de crecimiento microbiano (Figura 3.1) por lo que el consumo de azúcares reductores fue el mayor. A partir de este día, el crecimiento del microorganismo fue constante por lo que el consumo de azúcares reductores fue menor, aunado a esto, la actividad enzimática de *L. plantarum* A6 aumentó la concentración de azúcares reductores.





### 3.6 Almidón

Para la determinación del contenido de almidón en la masa se utilizó el kit enzimático STA20 (Sigma-Aldrich, México); los datos obtenidos por este método se muestran en la Figura 3.5.

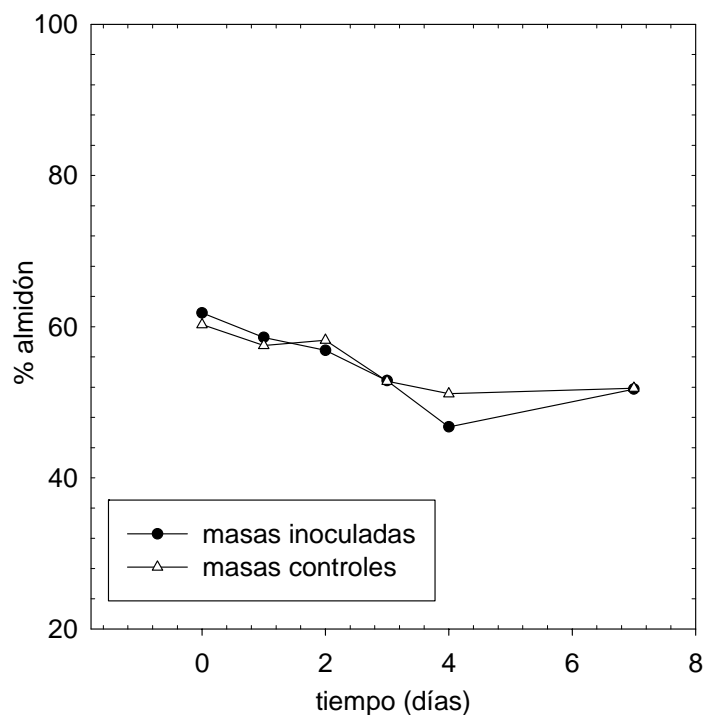


Figura 3.5. Variación del contenido de almidón durante el tiempo de fermentación de las masas control e inoculadas con *L. plantarum* A6.

Estadísticamente existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el contenido de almidón de cada día del periodo de fermentación de las masas inoculadas pero aunque también la hay entre los contenidos de las masas control, gráficamente se observa que las masas inoculadas tienen una tendencia de disminución en el contenido de almidón ligeramente más acentuada que las masas control debido a la actividad microbiológica presente.





Los cambios observados no fueron los esperados: en las masas control se encontró un descenso aunque mínimo en el contenido de almidón y en las masas inoculadas un aumento en el contenido de este polímero a partir del cuarto día. Estos cambios pueden deberse a que por el tipo de muestra, los componentes de la masa no estaban distribuidos de forma completamente homogénea por lo que pudo haber variabilidad en cada replica. También, el descenso en el contenido de almidón en las masas control podría deberse a la presencia de enzimas endógenas del maíz.

La actividad microbiológica no se ve tan reflejada con esta determinación porque el método utilizado mide el almidón total presente en la muestra y no en sí, la degradación del almidón por el rompimiento de sus cadenas causado por la actividad amilolítica de *L. plantarum* A6.

Además, se cree que el tiempo de fermentación es corto como para notar grandes diferencias en esta determinación, y que si se dejara transcurrir la fermentación en la masa, la disminución en el contenido de almidón ocasionado por la actividad biológica en comparación con las masas control sería marcadamente mayor.

### **3.7 Comportamiento reológico**

En la Figura 3.6 se muestra el comportamiento reológico de las masas inoculadas y control durante los siete días de fermentación. Se observan cambios similares tanto en las masas inoculadas como en las masas control en cuanto a la conducta de los módulos  $G'$  y  $G''$  durante el tiempo estudiado. En la Figura 3.7 podemos notar en ambas masas (más claramente en  $G'$ ) un descenso en los módulos hasta los tres primeros días de fermentación y, después de este día, un aumento hasta casi los valores iniciales.



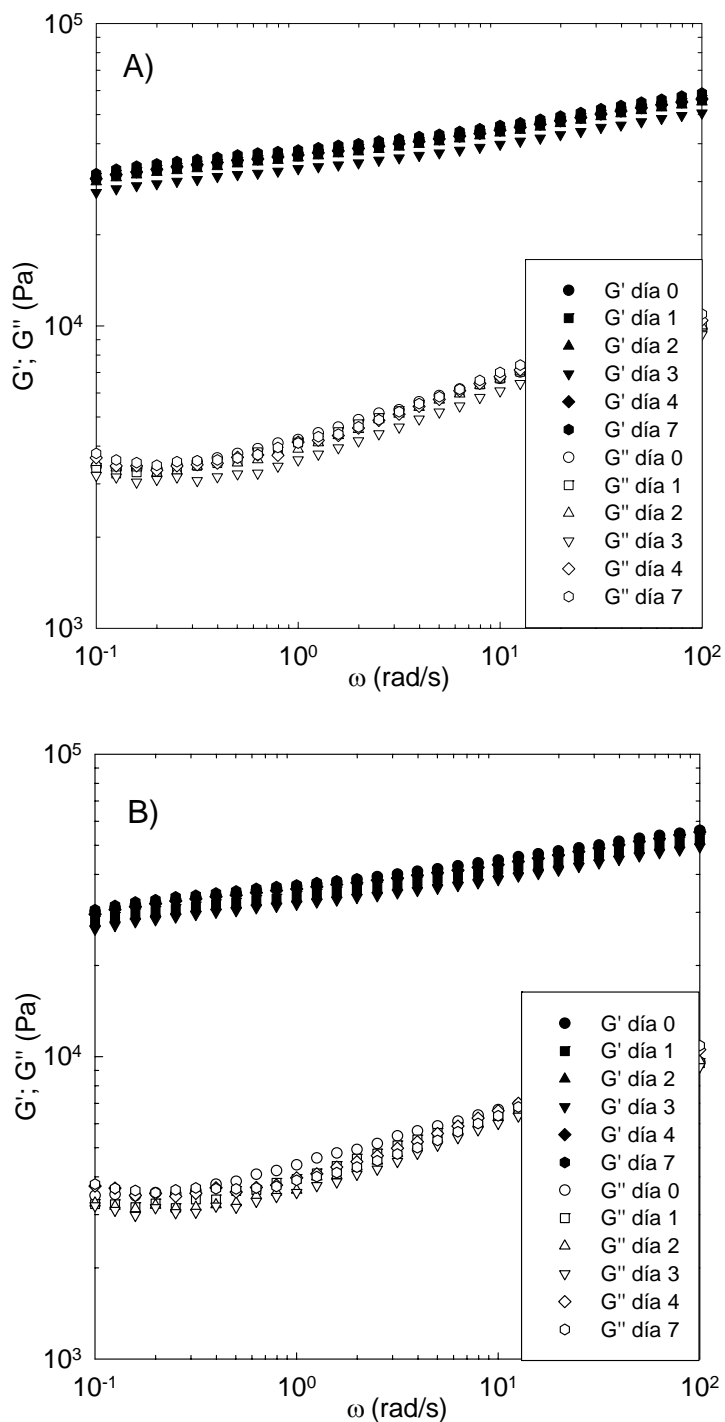


Figura 3.6. Variación de los módulos dinámicos con la frecuencia en la masa control (A) e inoculada con *L. plantarum* A6 (B) a diferentes días de fermentación. Las mediciones se llevaron a cabo a 25° C y a 0.1% de deformación.







Para las masas inoculadas,  $G'$  disminuyó alrededor de un 13%, mientras que  $G''$  tuvo un descenso mayor a bajas frecuencias (18 y 11% para 0.628 y 6.28 rad/s, respectivamente) y del 2% para frecuencias más altas (62.8 rad/s). En cuanto a las masas control, estas disminuciones fueron menos marcadas, de 10% para  $G'$  y de 17, 12, y 6% para 0.628, 6.28 y 62.8 rad/s respectivamente, lo que propondría que hubo mayores cambios en las propiedades viscoelásticas en las masas inoculadas que en las masas control a causa de la actividad microbiológica.

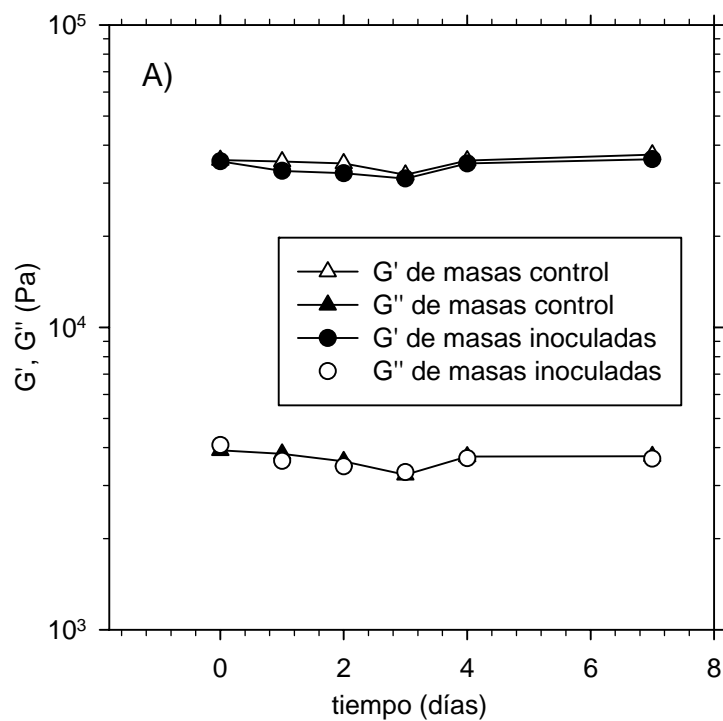


Figura 3.7 A)



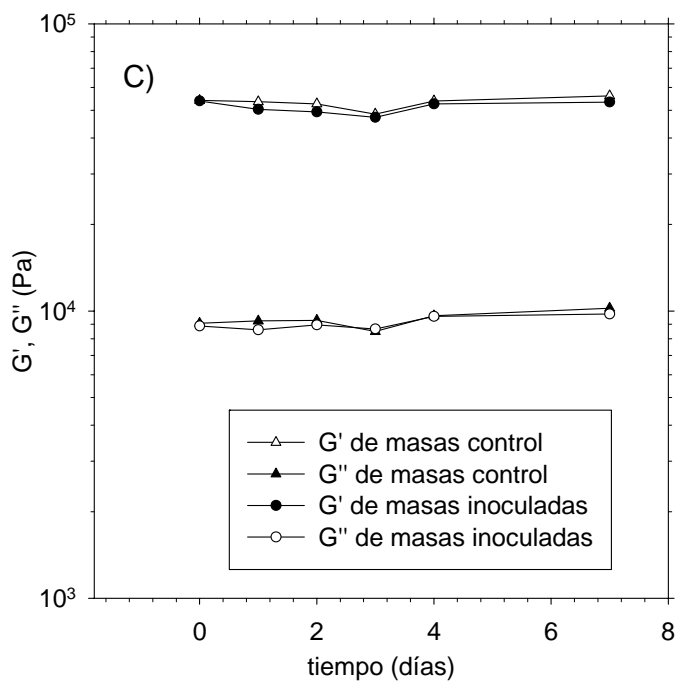
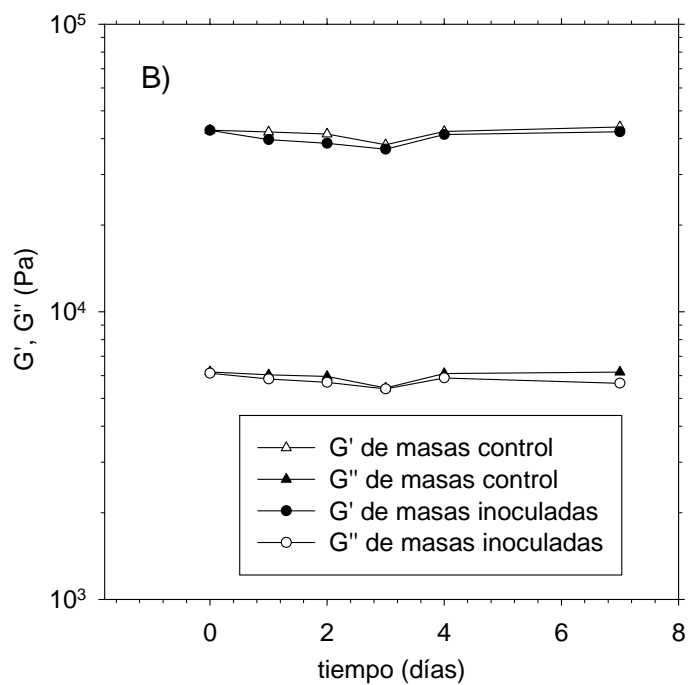


Figura 3.7. Variación de los módulos dinámicos con el tiempo de fermentación a diferentes frecuencias: A) 0.628, B) 6.28 y a C) 62.8 rad/s.



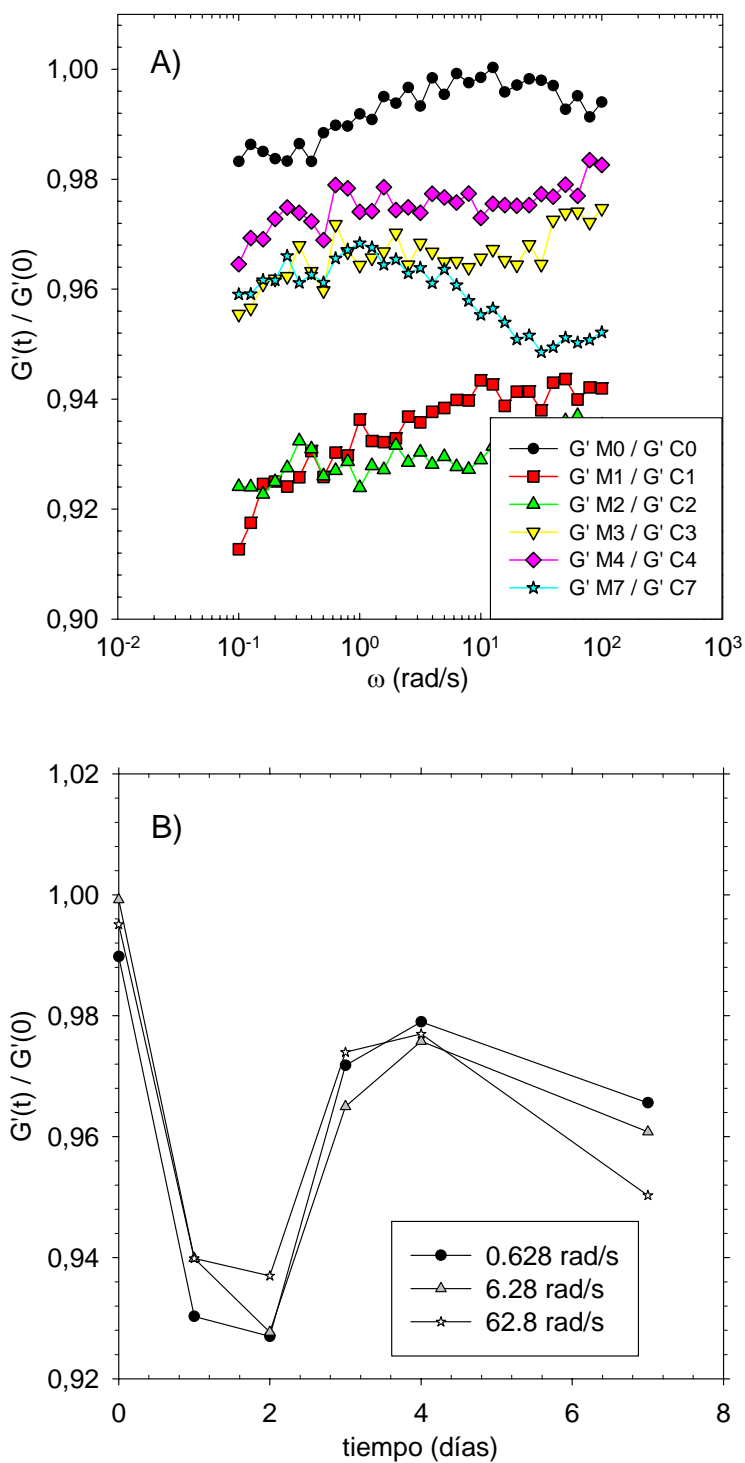


Figura 3.8. Variación con la frecuencia del cociente de los módulos dinámicos  $G'$  de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control (A) y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).





Para verificar la diferencia en la disminución de los módulos dinámicos entre ambas muestras, se calculó un cociente de los módulos de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control para cada día de fermentación. Se observa una disminución del módulo  $G'$  durante los dos primeros días, pues el cociente de los módulos es aproximadamente 7% inferior al día cero para el segundo día. En los días tres y cuatro hay un aumento en  $G'$  con respecto al día dos, sin embargo, estos valores se mantienen aún por debajo del día cero (2%) (Figura 3.8).

La disminución en el módulo  $G'$  es explicada por la degradación del almidón por *L. plantarum* A6 presente en la masa de maíz. Esto trajo como consecuencia cambios en las propiedades viscoelásticas de este sustrato, provocando durante la fermentación de las masas inoculadas una disminución en su carácter sólido-elástico debido a que se lleva a cabo la hidrólisis del almidón (asumiendo que es el componente que le confiere gran parte de sus propiedades viscoelásticas a la masa de maíz) en hidratos de carbono de cadena corta.

El cociente de  $G''$  muestra una gran dispersión a altas y bajas frecuencias. En los días cuatro y siete se observa una fuerte dependencia con la frecuencia y disminuye desde 1.02 hasta 0.96 en frecuencias de 0.5 rad/s, volviendo a valores de 1.01 para el día 4, mientras que al día siete disminuye desde 1.00 hasta 0.90 llegando a 0.99 en frecuencias de 100 rad/s. Este comportamiento indica el carácter viscoso de la masa y su tendencia a fluir en los últimos días de fermentación (Figura 3.9).

En la Figura 3.10 se observan las variaciones de las tangentes de los ángulos de desfase ( $\tan \delta$ ) de las masas control e inoculadas. Con este parámetro se nota mucho mejor la variación del comportamiento reológico de las masas, ya que  $\tan \delta$  es el cociente entre el carácter viscoso ( $G''$ ) y el elástico ( $G'$ ), y este valor representa más claramente la relación que existe entre estos dos módulos, es decir, el carácter viscoelástico.



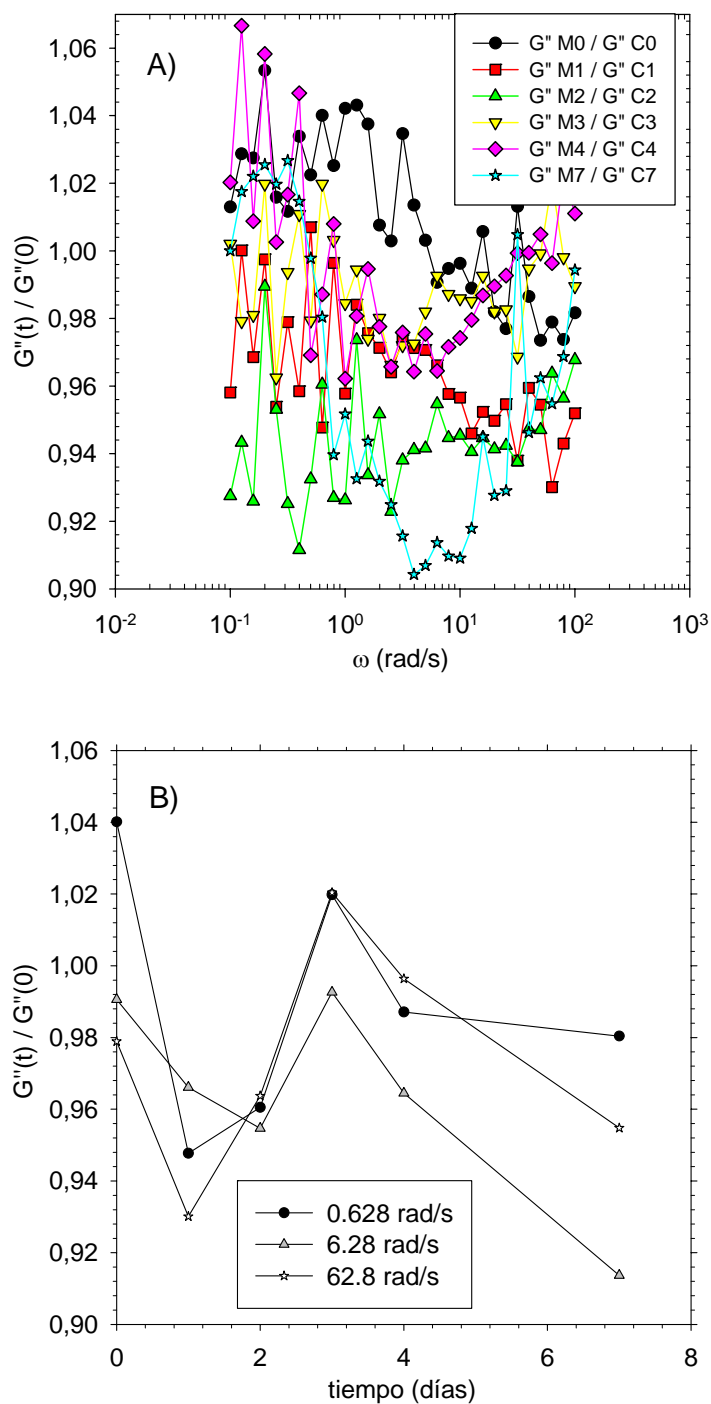


Figura 3.9. Variación con la frecuencia del cociente de los módulos dinámicos  $G''$  de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control (A), y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).



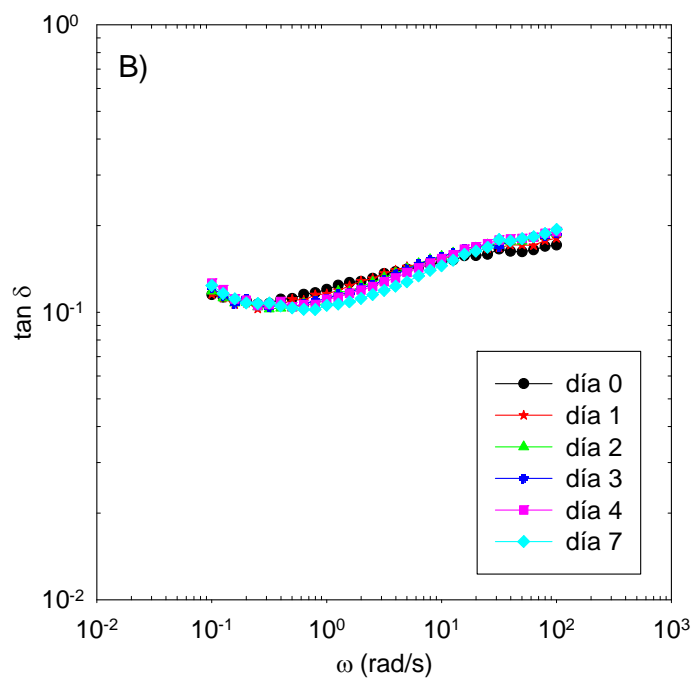
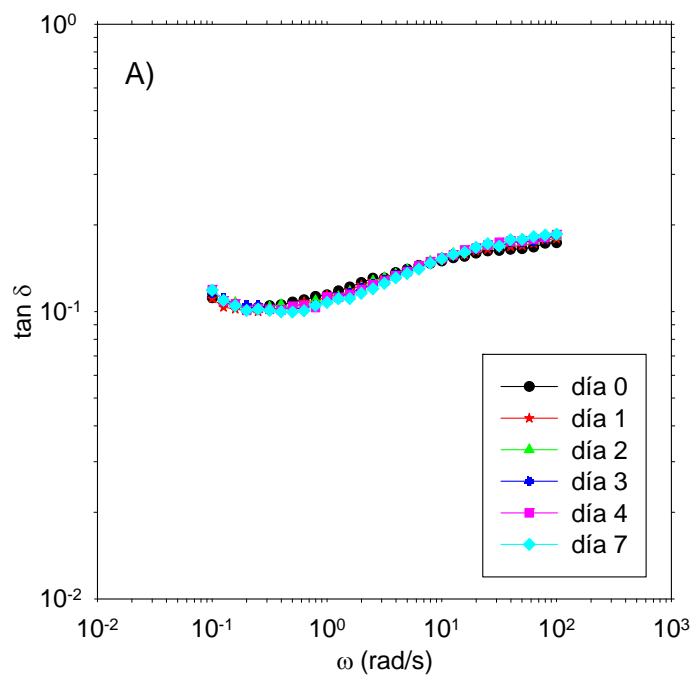


Figura 3.10. Variación de la tangente del ángulo de desfase con la frecuencia de la masa control (A) y de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 a cada día de la fermentación (B).





La Figura 3.11 indica los cambios en el comportamiento del carácter viscoelástico ( $\tan \delta$ ) y representa el mismo parámetro de la figura anterior pero ahora respecto a cada día, pudiendo así ver de forma más clara los cambios reológicos producidos en cada día de fermentación. Aunque el comportamiento predominante durante todo el tiempo de fermentación fue elástico, ya que el módulo  $G'$  fue siempre superior a  $G''$ , durante los tres primeros días de fermentación se observa un ligero aumento en el carácter viscoso debido a los cambios esperados por la presencia de *L. plantarum* A6. Como ya se había notado con otros parámetros, después de este periodo el comportamiento reológico no fue congruente con las expectativas, pues se esperaba que durante la fermentación hubiera siempre una pérdida en la elasticidad de la masa por la hidrólisis microbiológica del almidón. El comportamiento después del tercer día se le atribuye a la progresiva gelatinización del almidón, aunque ésta es solo un supuesto pues en este estudio no comprobamos químicamente el estado del almidón a lo largo de la fermentación.

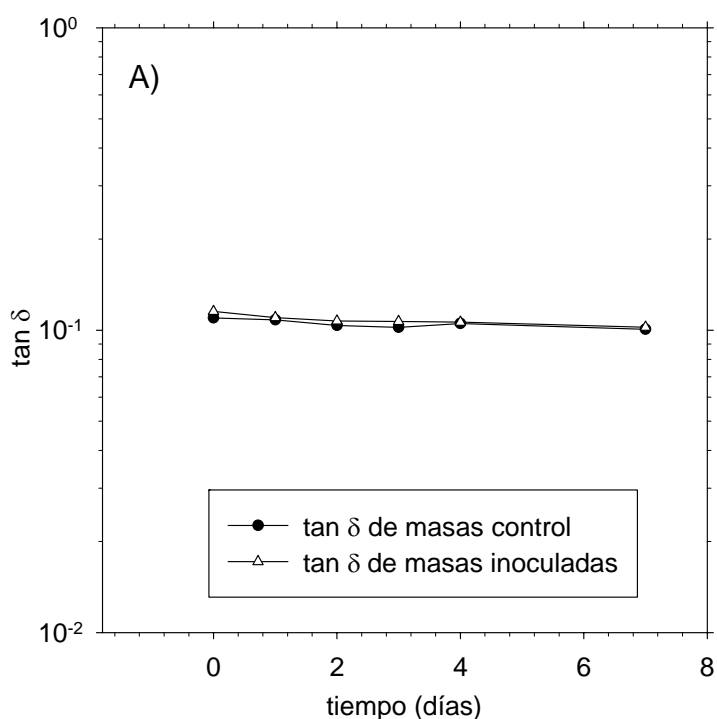


Figura 3.11 A)



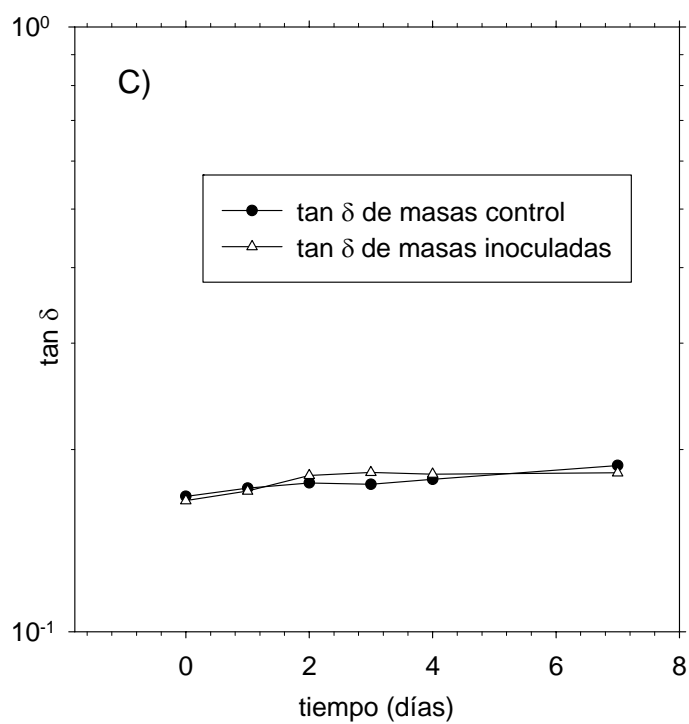
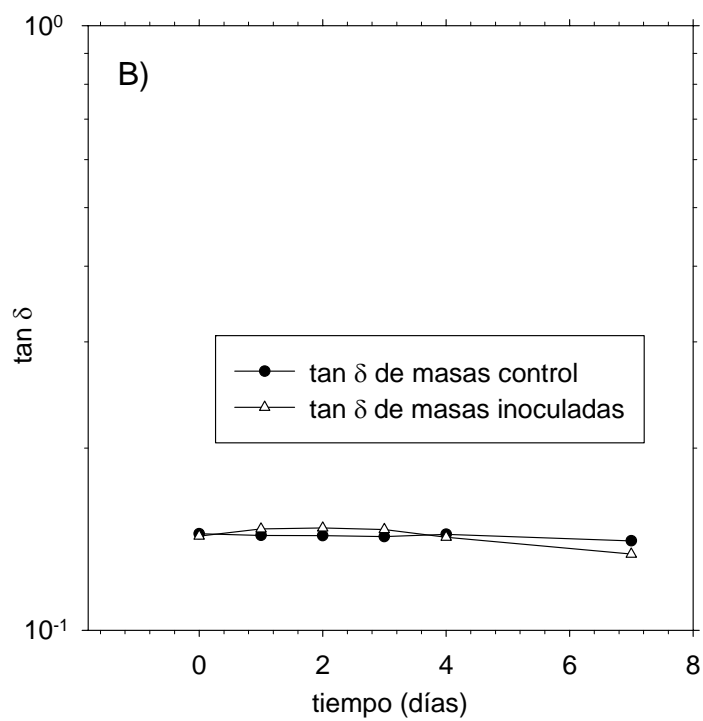


Figura 3.11. Variación de la tangente del ángulo de desfase con el tiempo de la tercera fermentación a diferentes frecuencias: A: 0.628, B: 6.28 y a C: 62.8 rad/s.





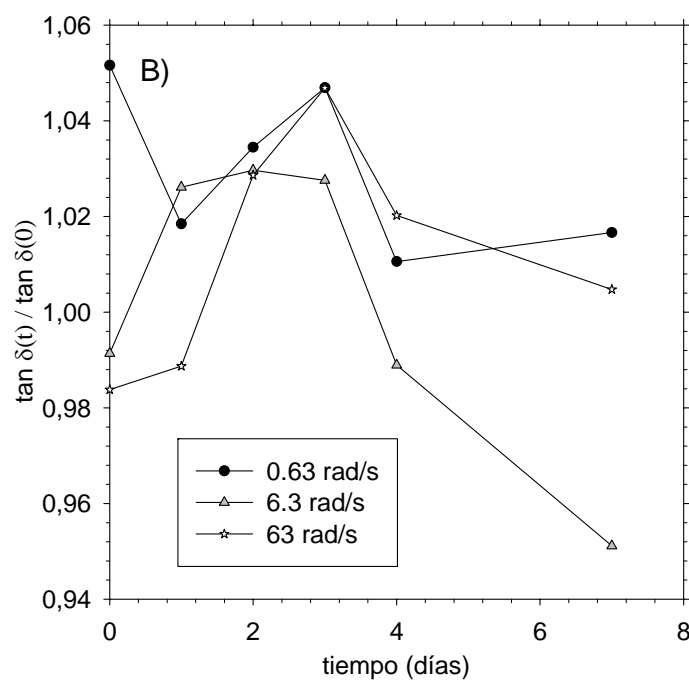
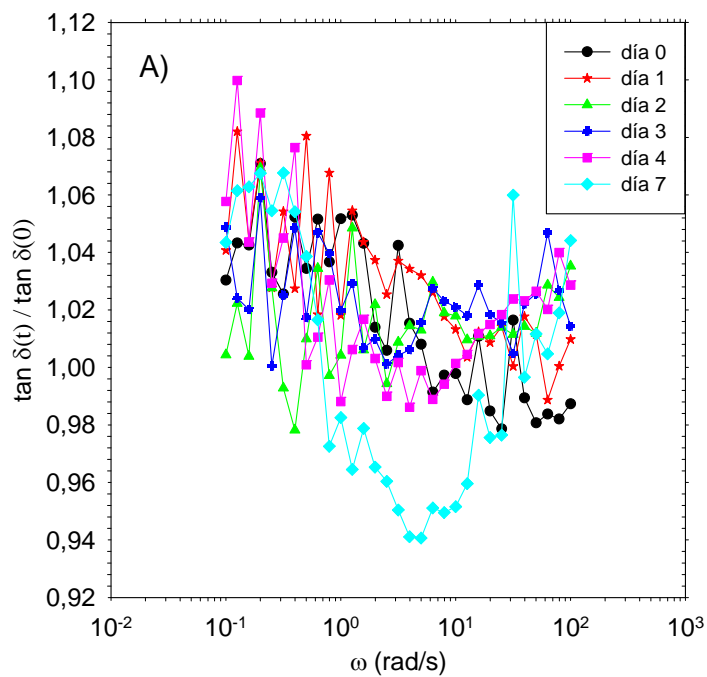


Figura 3.12. Variación con la frecuencia del cociente de la tangente del ángulo de desfase de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre la tangente del ángulo de desfase de la masa control (A), y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).





Debido a que los valores obtenidos de las masas inoculadas se empalman con los de las control en la Figura 3.10 y en la Figura 3.11 y no se aprecian tan explícitamente los cambios producidos cada día, se decidió calcular el cociente de  $\tan \delta$  de las masas inoculadas entre las masas control para poder distinguir los cambios entre ambas. Los cambios que observados en la Figura 3.11 son de las masas *per se* sin compararlas tácitamente con las masas control respectivos, mientras que el cociente hace alusión a la diferencia que hay entre los cambios de las masas y sus controles, por lo que con esta representación gráfica (Figura 3.12) son más evidentes los cambios ya explicados: un aumento en el carácter viscoso hasta el tercer día seguido del descenso de este mismo en los siguientes días.

En una segunda determinación del comportamiento reológico durante otra fermentación de masa de maíz bajo las mismas condiciones, fue menos evidente una tendencia determinante. En el caso de las masas control, se mostró un consecutivo aumento en ambos módulos,  $G'$  y  $G''$ , durante los siete días de fermentación.

Mientras que en las masas inoculadas el comportamiento de los módulos varió durante el tiempo de estudio: los valores de los módulos aumentaron y disminuyeron día a día hasta finalizar la fermentación. A pesar de esta conducta, podemos decir que los módulos  $G'$  y  $G''$  siempre fueron en aumento a lo largo de la fermentación, porque aunque hubo disminuciones, los valores de estas nunca fueron menores al descenso anterior; y los valores de los incrementos siempre fueron mayores tanto al día anterior como al último aumento (Figuras 3.13 y 3.14). Otra característica de esta segunda determinación, es que, al igual que en la primera, los valores de ambos módulos de las masas inoculadas fueron menores que los de las masas control, aunque en este caso, los valores de los módulos fueron incrementándose en el transcurso de la fermentación, tanto en las masas control como en las masas inoculadas.



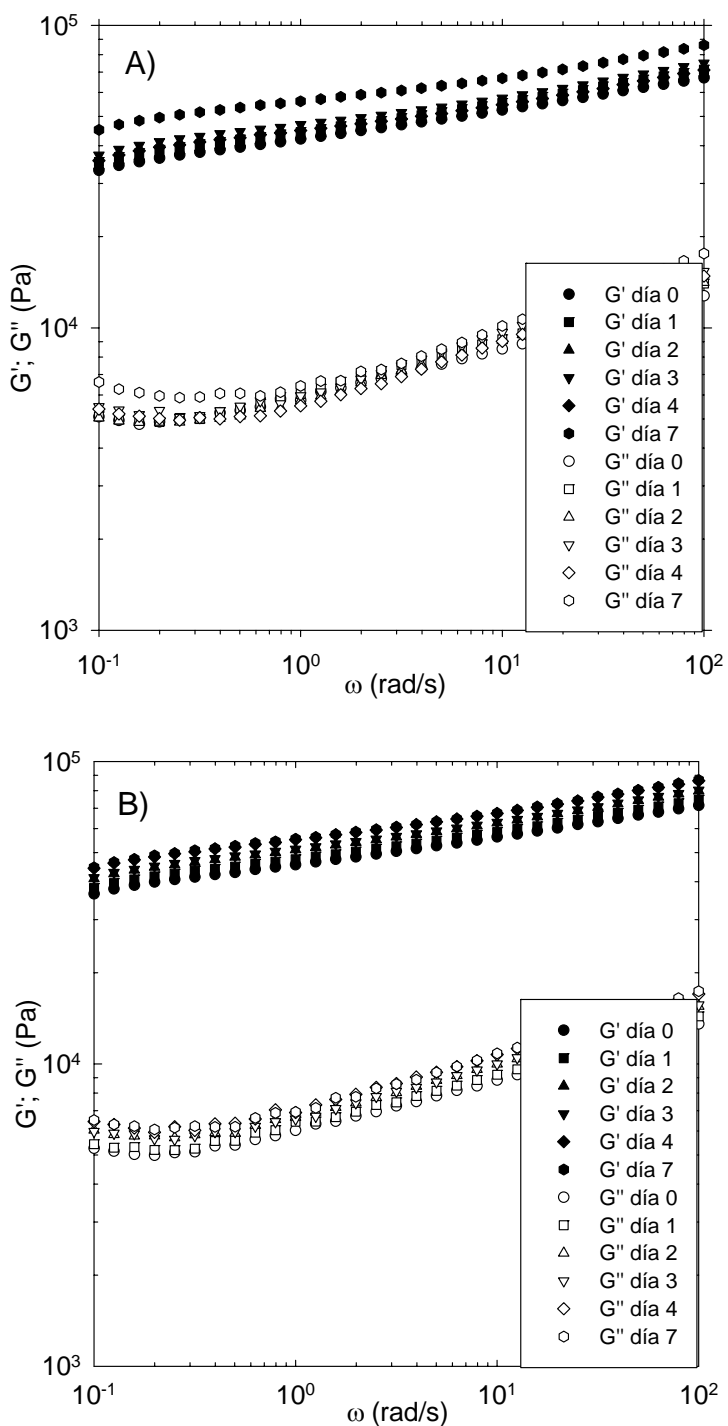


Figura 3.13. Variación de los módulos dinámicos con la frecuencia en la masa inoculada con *L. plantarum* A6 (A) y masa control (B) a diferentes días de la tercera fermentación. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y a 0.1% de deformación.



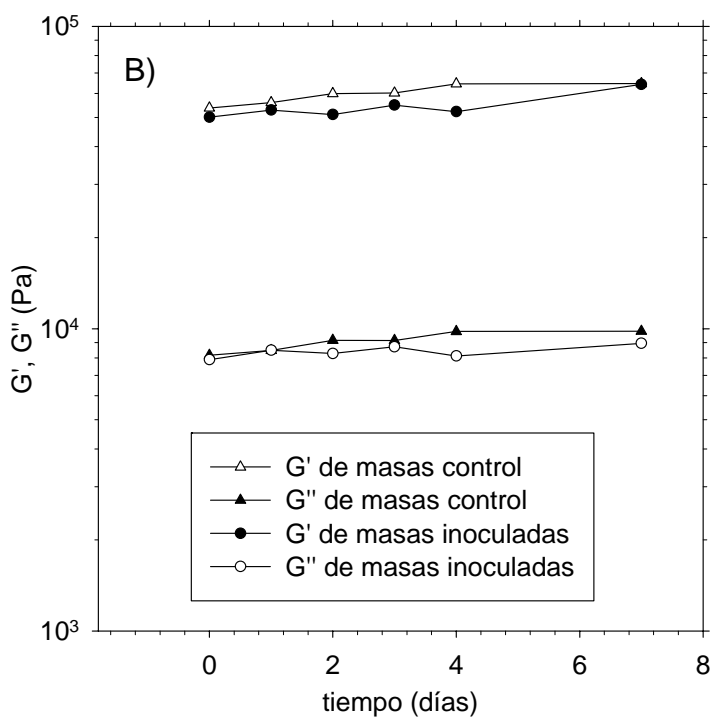
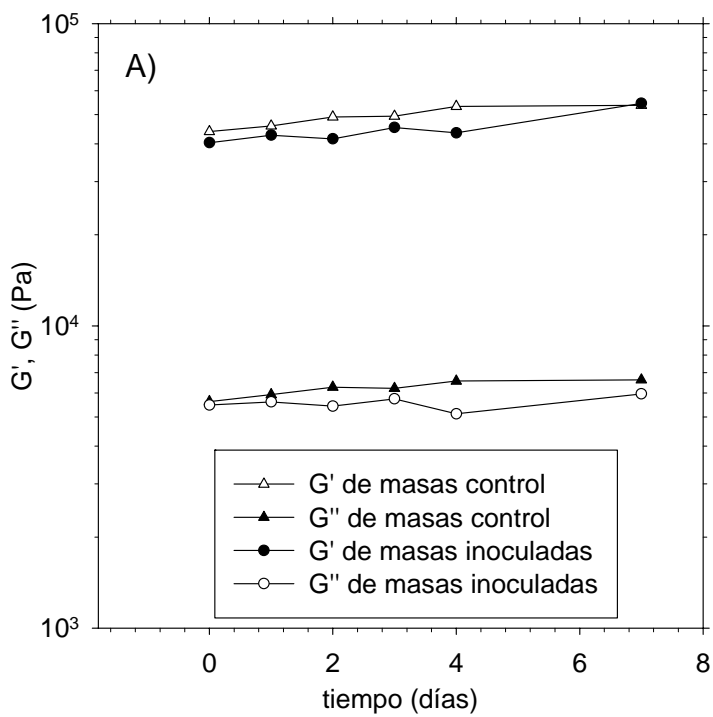


Figura 3.14 A) y B)



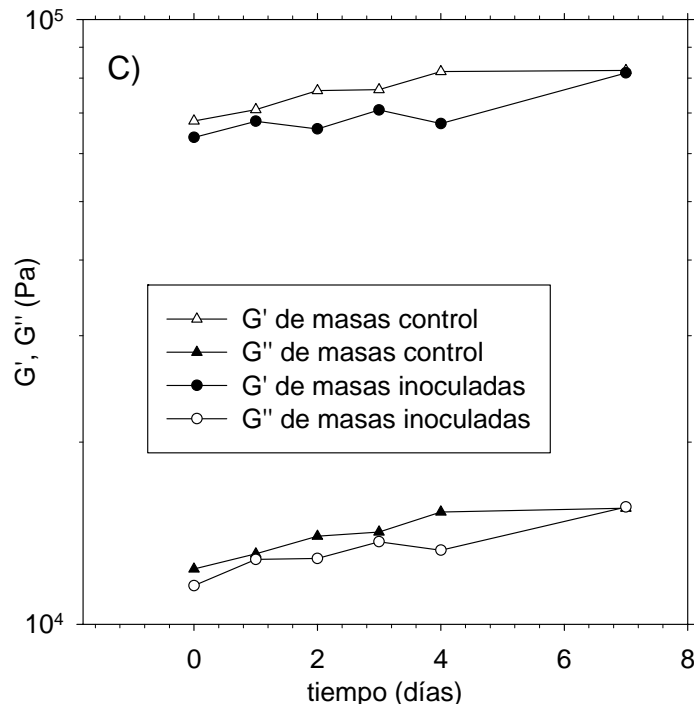


Figura 3.14. Variación de los módulos dinámicos con el tiempo de la tercera fermentación a diferentes frecuencias: A: 0.628, B: 6.28 y a C: 62.8 rad/s.

Las disminuciones observadas en los valores de los módulos representan cambios pequeños en las propiedades viscoelásticas de la masa que se pueden explicar por medio de la actividad microbiológica presente en ellas y, de acuerdo con los ensayos anteriores, con estos resultados también podemos suponer que el tiempo de fermentación es muy corto y, por consiguiente, los cambios observados no son apreciables.

Por otro lado, en el caso del aumento de los valores de los módulos, se puede decir que éste se debe a la gelificación del almidón, principalmente de la amilosa, Se piensa que conforme transcurre el tiempo de incubación, los cambios provocados por la gelificación no son tan drásticos y son ocultados por los cambios ocasionados por la actividad amilolítica, pero, a mayor tiempo, la gelificación se ve acentuada notándose así los cambios reológicos provocados por ésta: un aumento en la viscosidad, es decir, aumenta el carácter elástico.





Además, se supone la influencia en estos cambios por el aumento en la cantidad de la biomasa, esto es, que al aumentar el número de bacterias éstas pueden actuar sobre las propiedades reológicas de la masa proporcionándole un carácter más elástico que viscoso, aunque realmente no se sabe de qué manera y con qué intensidad afecte la cantidad de biomasa creada a los cambios reológicos.

De igual forma que en la primera fermentación, se calculó un cociente de los módulos de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control para cada día de fermentación, con el fin de verificar la diferencia en la disminución de los módulos dinámicos entre ambas muestras. Inicialmente el valor del cociente entre las masas inoculadas y sus controles debería ser aproximadamente de uno, ya que, en principio, al tiempo cero no existen diferencias entre ambos tipos de masas puesto que aún no empieza la actividad amilolítica. Sin embargo, el valor obtenido del cociente no es uno, debido a que las mediciones reológicas de las masas inoculadas no se realizaron enseguida de la inoculación con *L. plantarum* A6 y agua estéril respectivamente: la determinación de las propiedades reológicas de las masas inoculadas se realizó cinco horas aproximadamente a partir de su inoculación, por lo que muy posiblemente ya había cierta acción amilolítica por *L. plantarum* A6 al momento de la medición.

Se observa una disminución del módulo  $G'$  hasta el cuarto día de fermentación, ya que el cociente de los módulos es aproximadamente 12% inferior al día cero para el cuarto día. Del día cuatro al siete hay un aumento en  $G'$  sobrepasando los valores del día cero (8.6% aprox.) La disminución en el módulo  $G'$  es explicada por la degradación del almidón por *L. plantarum* A6 presente en la masa de maíz y como consecuencia confiere cambios en las propiedades viscoelásticas de este sustrato. Mientras que el incremento en el módulo  $G'$  del día cuatro al siete, puede ser atribuido a la gelificación del almidón, como ya se explicó anteriormente (Figura 3.15).



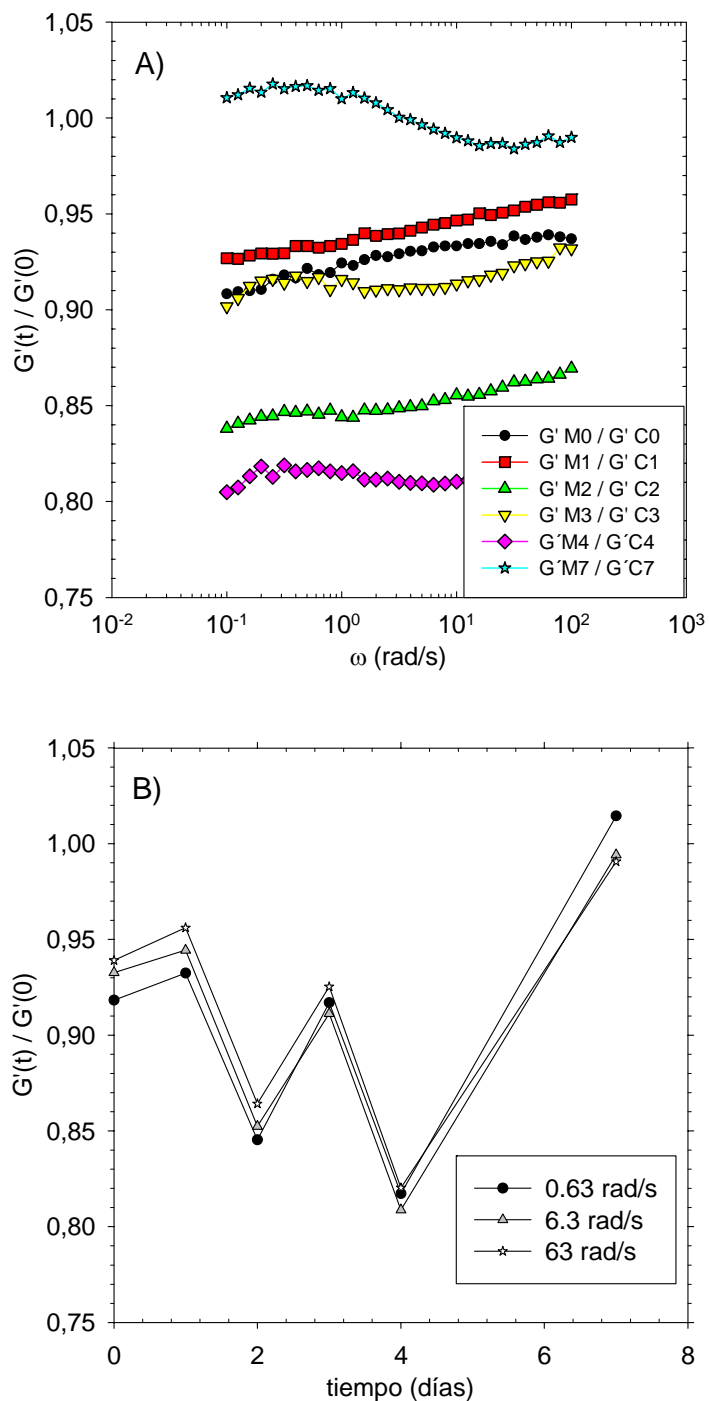


Figura 3.15. Variación con la frecuencia del cociente de los módulos dinámicos  $G'$  de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control (A) y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).



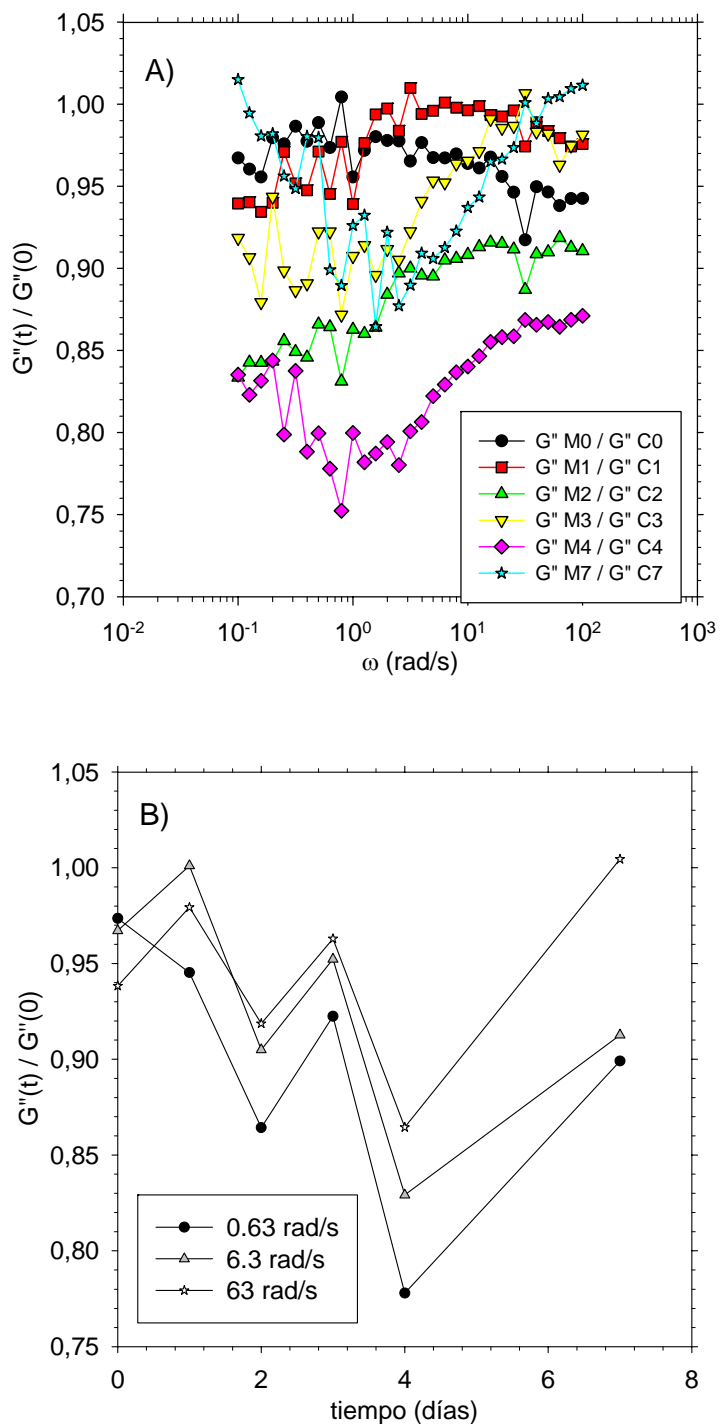


Figura 3.16. Variación con la frecuencia del cociente de los módulos dinámicos  $G''$  de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre los módulos de la masa control (A), y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).





El cociente de  $G''$  muestra una gran dispersión a bajas frecuencias. En el día siete se observa una fuerte dependencia con la frecuencia, disminuyendo desde 1.02 a 0.10 rad/s hasta 0.864 para frecuencias de 1.60 rad/s y volviendo a valores de 1.01 para frecuencias de 100 rad/s. Este comportamiento indica el carácter viscoso de la masa y su mayor tendencia a fluir en el último día de fermentación (Figura 3.16).

La Figura 3.17 muestra la variación del ángulo de desfase con la frecuencia. Con este parámetro se pueden ver de forma más clara los cambios en el comportamiento viscoelástico de las muestras. Como se observa en esta representación, los cambios ocurridos en las masas control son despreciables, pues los puntos obtenidos para cada día de la fermentación caen en los mismos valores. Por otro lado en las masas inoculadas, a bajas frecuencias (1 rad/s aproximadamente) el valor de la tangente va disminuyendo con respecto al tiempo, es decir, aumenta el carácter viscoso, mientras que a altas frecuencias (aproximadamente a 100 rad/s), esta tendencia se invierte notándose un aumento en el valor de la tangente a cada día de la fermentación. Este comportamiento con respecto al tiempo se aprecia mejor en la Figura 3.18.

De la misma forma que en la primera fermentación los valores de la tangente del ángulo de desfase de las masas control se mantienen constantes en los siete días de fermentación. A bajas frecuencias (0.628 rad/s) hay una pequeña disminución en los valores de la tangente del ángulo de desfase, empero, a mayores frecuencias (6.28 y 62.8 rad/s) del día cero al día tres hay un aumento en el carácter viscoso, disminuyendo éste en los consecutivos días (Figura 3.18).



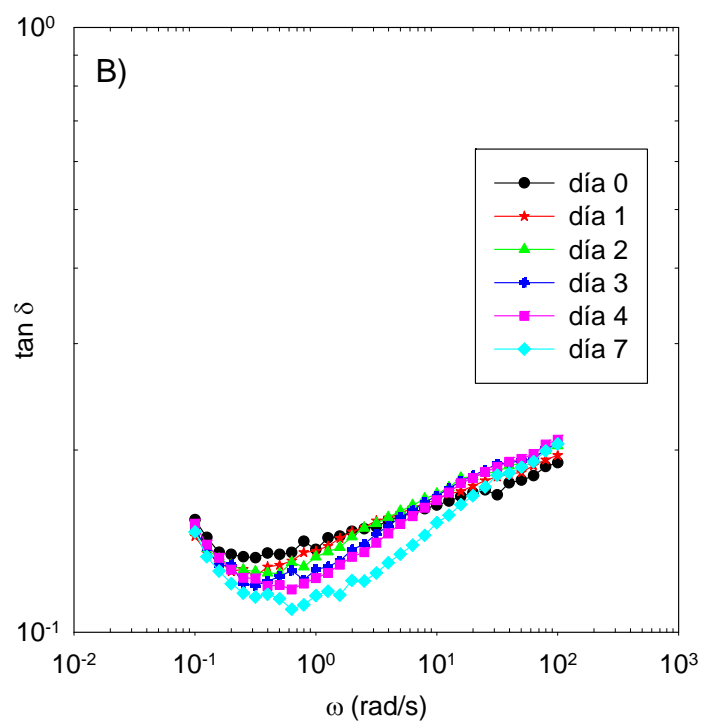
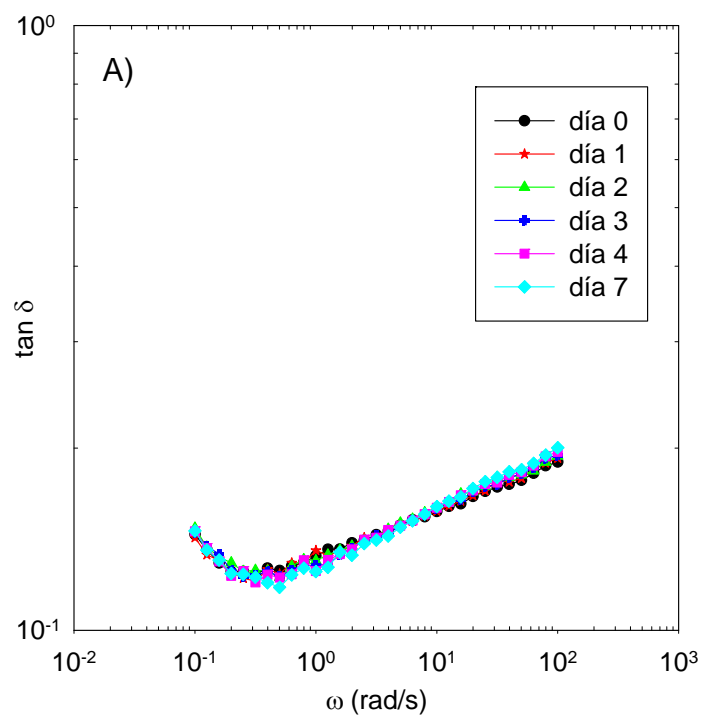


Figura 3.17. Variación de la tangente del ángulo de desfase con la frecuencia de la masa control (A) y de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 (B) a cada día de la fermentación.



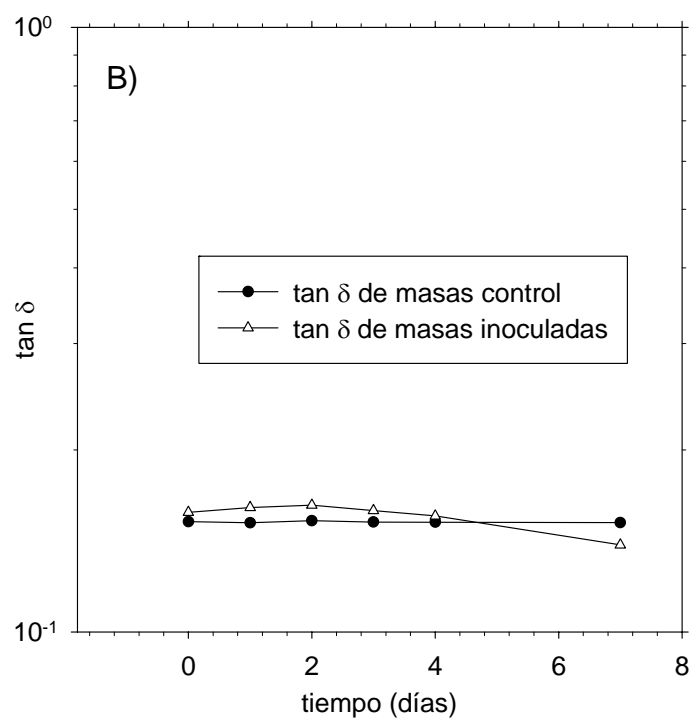
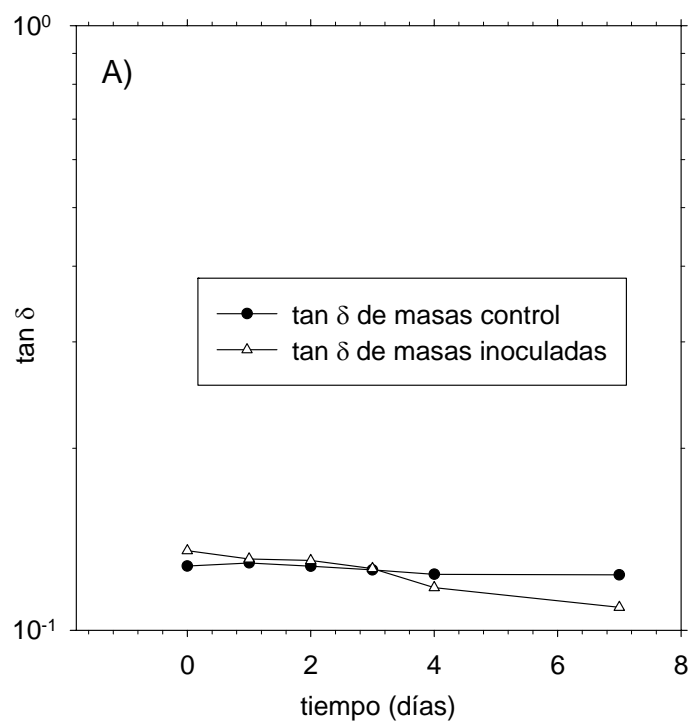


Figura 3.18 A) y B)



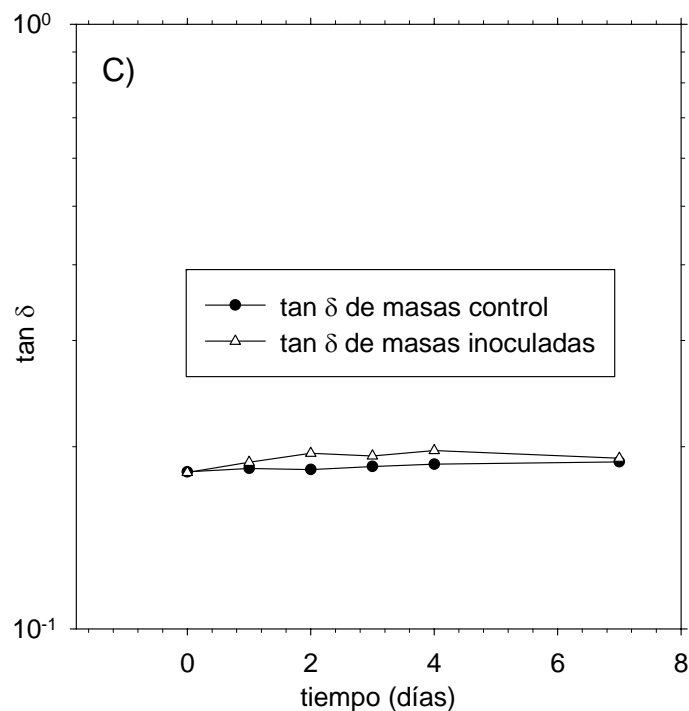


Figura 3.18. Variación de la tangente del ángulo de desfase con el tiempo de la segunda fermentación a diferentes frecuencias: A: 0.628, B: 6.28 y a C: 6.28 rad/s.

Como ya se mencionó, el cociente de las masas inoculadas y su control proporciona una mejor visión de los cambios reológicos producidos, porque al realizarlo se eliminan las variaciones de las masas control en las masas inoculadas. En esta segunda fermentación se encontró un aumento en el carácter viscoso hasta el segundo día pero éste disminuye en los siguientes (Figura 3.19).



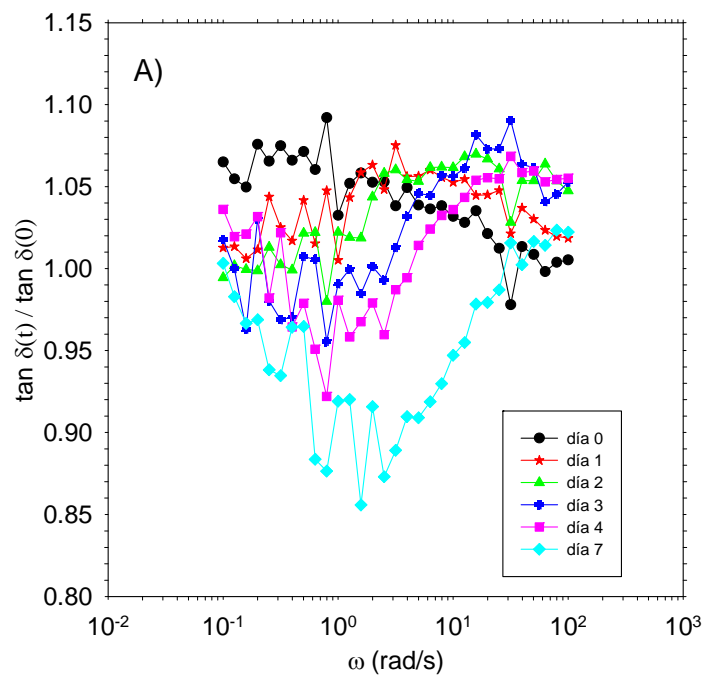


Figura 3.19 A)

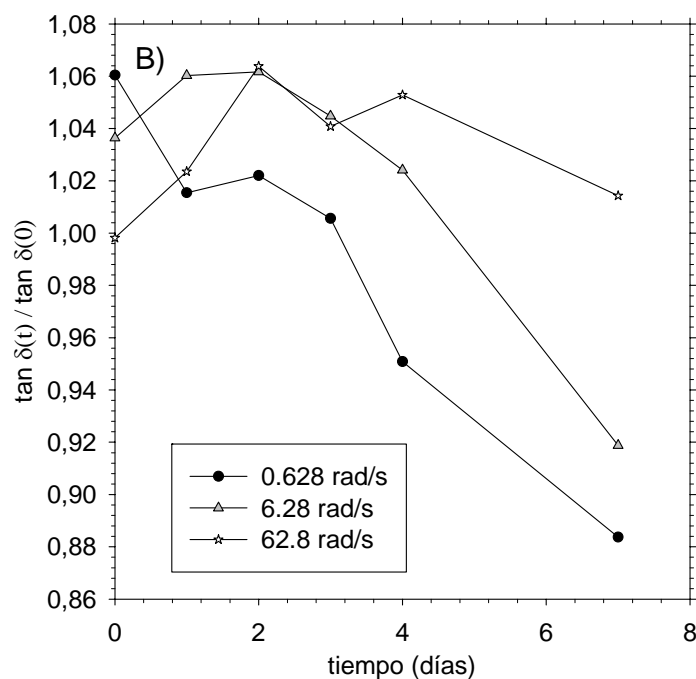


Figura 3.19. Variación con la frecuencia del cociente de la tangente del ángulo de desfase de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 entre la tangente del ángulo de desfase de la masa control (A), y variación de este cociente con respecto al tiempo a diferentes frecuencias (B).



Los resultados estadísticos (Apéndice 2) indican que sí hubo diferencia de los módulos  $G'$  y  $G''$  durante ambos periodos de fermentación tanto para las masas control como para las masas inoculadas. En ambas fermentaciones se encontró una  $F$  calculada mayor en las masas inoculadas que en las masas control para el caso del módulo de almacenamiento, es decir, hubo mayor diferencia en presencia de actividad amilolítica durante el tiempo de fermentación en el módulo  $G'$ . Caso contrario en el módulo de pérdida, donde se halló una mayor diferencia del módulo  $G''$  en las masas control a lo largo de las 2 fermentaciones, ya que el valor de  $F$  calculada fue mucho mayor en las masas control que en las inoculadas. Estos resultados se atribuyen a que si el comportamiento reológico de las masas control sólo está determinado por la gelificación del almidón (aumento en el carácter elástico), mientras que en las masas inoculadas lo está por la hidrólisis y gelatinización del almidón, entonces los mayores cambios en los módulos, de  $G'$  en las masas inoculadas y de  $G''$  en las control, proponen que la gelificación del almidón se ve reflejada en cambios más notorios del módulo de pérdida y la hidrólisis del almidón se refleja en mayores cambios del módulo de almacenamiento.

El análisis de varianza del ángulo de desfase ( $\tan \delta$ ) mostró, en ambos periodos de fermentación, que hubo diferencia de la  $\tan \delta$  con respecto al tiempo tanto en las masas inoculadas como en las control, pero los mayores cambios en las propiedades viscoelásticas, de acuerdo a la  $\tan \delta$ , se dieron en las masas donde había actividad amilolítica, ya que el valor de  $F$  para las masas inoculadas fue mucho mayor que el de las masas control. El que se encontraran mayores cambios en las masas inoculadas se explica porque en éstas hubo actividad amilolítica dada por *L. plantarum* A6, la cual confirió modificaciones reológicas más importantes que en las masas control, a pesar de que aparentemente el contenido de almidón no cambiara significativamente durante el tiempo de fermentación, no así, posiblemente, el tamaño del polímero.

En la Figura 3.20 se comparan los módulos  $G'$  y  $G''$  de las dos diferentes fermentaciones en las que se realizaron pruebas reológicas. Como en la primera





fermentación el comportamiento reológico no fue el esperado, se realizó una repetición de las determinaciones reológicas para comprobar que no se había presentado algún tipo de error en las mediciones de la primera fermentación. La diferencia que existe entre ambas determinaciones es el valor de los módulos  $G'$  y  $G''$ , estos resultaron superiores en la segunda fermentación, lo que puede deberse a que las dos determinaciones se llevaron a cabo con diferentes lotes de masa, los cuales tenían diferencias perceptibles como el color y la textura. Sin embargo, la tendencia que presentan es similar; observándose un pequeño descenso en los primeros días y posteriormente un aumento; otra similitud es que los valores de las masas inoculadas siempre estuvieron por debajo de los valores de las masas control.

La Figura 3.21 representa una comparación entre los cambios reológicos determinados en dos diferentes fermentaciones de masa de maíz nixtamalizado con *L. plantarum* A6 bajo las mismas condiciones utilizando el parámetro del cociente de la tangente del ángulo de desfase de la masa inoculada y la de la masa control a una frecuencia de 6.28 rad/s. En ambas ocasiones que se realizaron las pruebas reológicas, el comportamiento que siguieron durante los siete días de fermentación fue muy similar. En ambos casos ocurrió un aumento en el carácter viscoso hasta el segundo y tercer día respectivamente, lo que se explica con la fragmentación del almidón por la acción amilolítica por *L. plantrarum*.

En los días posteriores se presenta un aumento en el carácter elástico, incluso sobrepasando los valores de las propiedades reológicas iniciales, atribuido a la gelificación del almidón, lo que ocasiona un aumento en la viscosidad, es decir, un aumento en el carácter elástico de la masa de maíz. Resultados de estudios sugieren que la gelificación, o las primeras etapas de la retrogradación, aparecen con la separación de fase seguida de una cristalización lenta en la fase rica del polímero. Evidencia apunta a que la cristalización es responsable de algunos de los cambios en las propiedades mecánicas de los geles de almidón (aumento en el módulo  $G'$  con respecto al tiempo (Miles *et al.*, 1984).



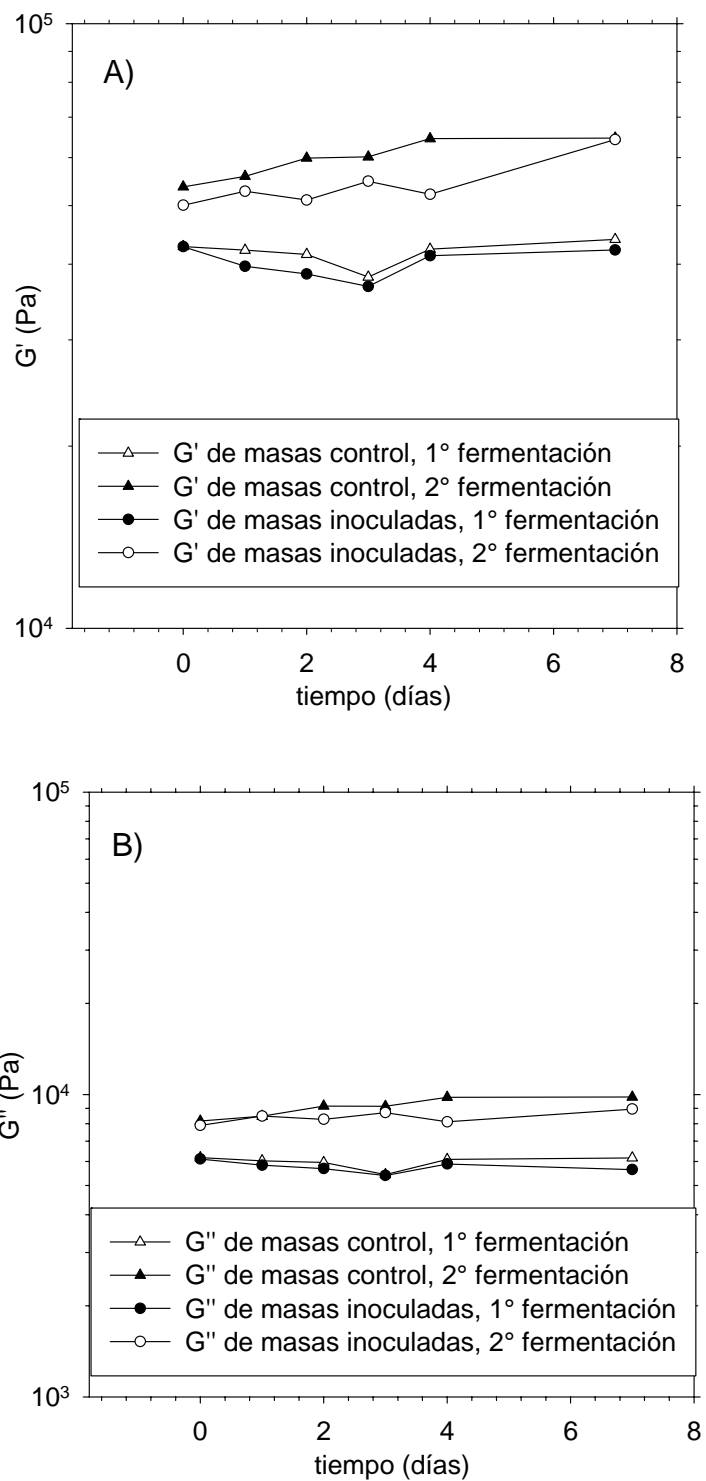


Figura 3.20. Variación de los módulos dinámicos  $G'$  (A) y  $G''$  (B) con el tiempo de dos diferentes fermentaciones a frecuencia de 6.28 rad/s





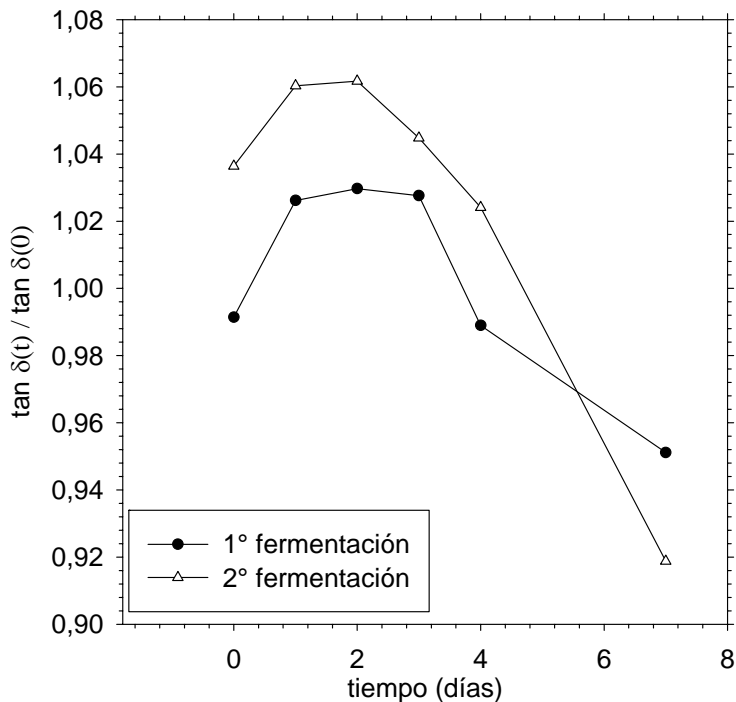


Figura 3.21. Variación del cociente de la tangente del ángulo de desfase de la masa inoculada con *L. plantarum* A6 y la tangente del ángulo de desfase de la masa control con respecto al tiempo de dos diferentes fermentaciones a frecuencia 6.28 rad/s

El objetivo principal de este estudio fue determinar la existencia de una relación entre la degradación del almidón por actividad de *L. plantarum* A6 con el comportamiento reológico de la masa de maíz nixtamalizado. Es por eso que en la Figura 3.22 se muestra el cambio en el contenido de almidón y la tangente del ángulo de desfase el cual representa al comportamiento viscoelástico durante los siete días de fermentación. Se observa que no existe una relación directa, clara y concisa entre estos dos parámetros. No obstante, como ya se ha mencionado, en ambos casos es notoria la diferencia que aporta la actividad microbiológica a la muestra en estudio. En el caso del contenido de almidón, un mayor descenso cuando está presente *L. plantarum* A6; mientras que en cuanto a las propiedades reológicas, un aumento en el carácter viscoso de la masa durante los primeros tres días en las masas inoculadas, cuando en las masas control estas propiedades permanecieron constantes a lo largo de la fermentación.



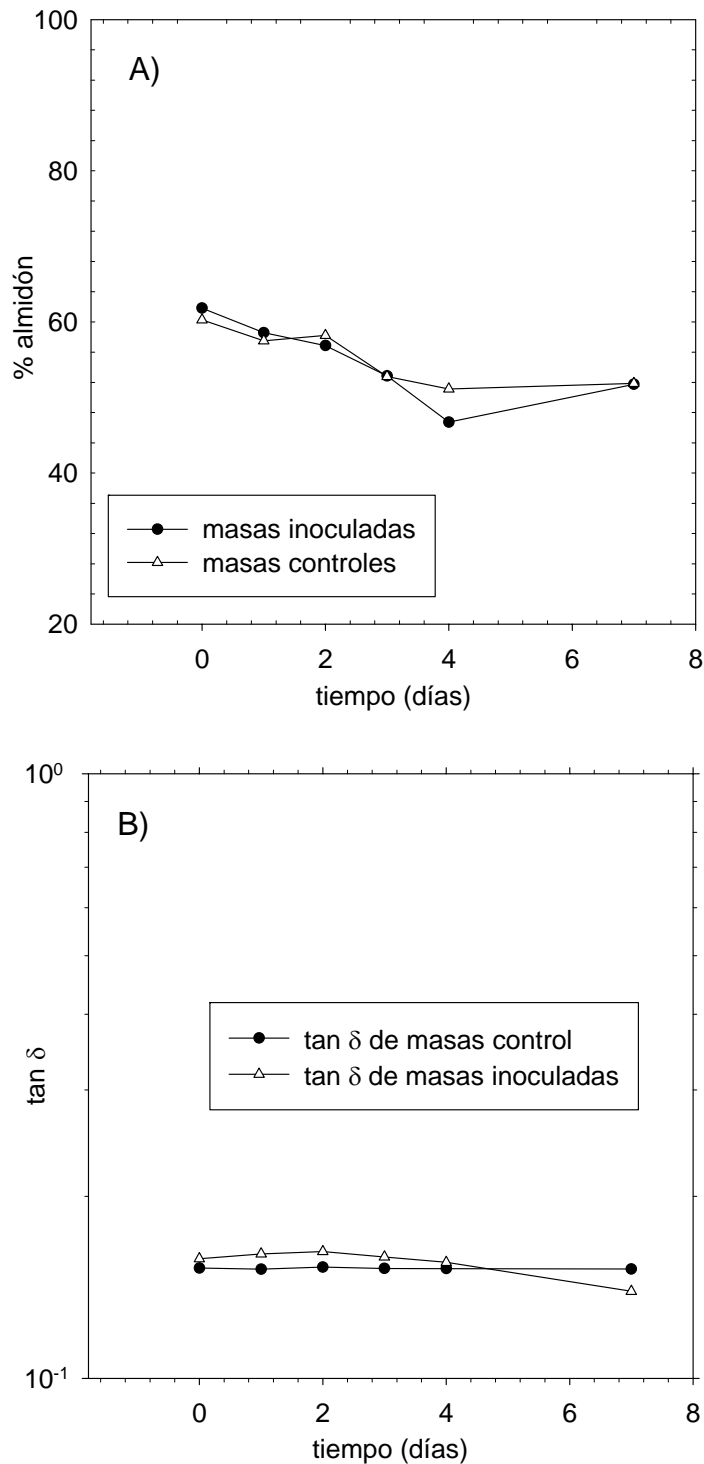


Figura 3.22. Variación del contenido de almidón (A) y variación de la tangente del ángulo de desfase a frecuencia 6.28rad/s (B) de las masas control e inoculadas con *L. plantarum* A6 con respecto al tiempo de fermentación.





---

## Conclusiones

- La actividad amilolítica junto con el crecimiento de *L. plantarum* A6 se reflejaron en cambios químicos ocurridos durante la fermentación de masa de maíz con este microorganismo. El mayor decremento de pH y de concentración de azúcares reductores durante los primeros 2-3 días, se puede asociar con la mayor pendiente de crecimiento del microorganismo.
- Los cambios más significativos (pH, % de acidez y microbiológicos) ocurren durante los primeros 7 días de la fermentación, mientras que los cambios en el contenido de almidón y reológicos posiblemente necesiten de un período de fermentación más largo para ser más apreciables.
- El comportamiento reológico se ve afectado por la presencia de un microorganismo amilolítico (*L. plantarum* A6), pero los cambios producidos no son tan evidentes durante el tiempo de fermentación estudiado.
- El comportamiento sólido-elástico disminuyó durante los primeros tres días de fermentación, sin embargo no se pudo relacionar la hidrólisis del almidón con el comportamiento reológico.





---

## Recomendaciones

- Verificar si la producción de biomasa afecta las propiedades reológicas de la masa de maíz.
- Probar la existencia de enzimas amilolíticas endógenas del maíz en la harina de maíz nixtamalizada, las cuales provocarían hidrólisis del almidón sin la inoculación del microorganismo amilolítico.
- Durante la fermentación, medir por medio de cromatografía de permeación en gel (GPC) el peso molecular del almidón para comprobar y relacionar la reducción de tamaño del polímero con los cambios reológicos.
- Determinar por calorimetría diferencial de barrido el estado químico del almidón a lo largo de la fermentación para poder determinar la presencia de retrogradación del almidón no hidrolizado y asociar esta característica con los cambios reológicos que se presentan en la masa al fermentarse.
- Evaluar la actividad enzimática a lo largo de la fermentación para determinar si se ve disminuida por la disminución de pH que ocurre en los primeros tres días.





---

## Bibliografía

- Akinrele, L. A., Cook, A. S. & Holgate, R. A. (1962). The manufacture of gari from cassava in Nigeria. 1st. International Congress of Food Science and Technology. Proceedings. Vol 4, pp 633-644.
- Ampe, F., Moizan, C., Wacher-Rodarte, C. & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the special distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464-5473.
- Badui, Dergal Salvador. Química de alimentos Pearson. Educación de México, S. A. de C. V. 4ª ed. México, 2006. pags 84-88
- Belitz, H. D. (1992). Química de los Alimentos. ACRIBIA, S. A., 2ª ed. España, Zaragoza. pp. 271-323, 337-351.
- Belitz, H. D. & Grosh, W. (1999). Química de los Alimentos. ACRIBIA, España.
- Bergey, D. H. (1986). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, pp 1-664.
- Boyer, C. D. y Shannon J. C. (1987). Carbohidrates of the Kernel. En: Corn Chemistry and Technology. Watson S. A. y Ramstad P. E. (Eds). American Association of cereal Chemist., Inc., St Paul Minessota. Pags 253-272.
- Canell, E. & Moo-Young, M. (1980). Solid-State fermentation systems. *Process Biochem.* 15, 2.
- Chevallier, B., J. C. Hubert & Benoit Kammerer (1994). Determination of Chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters.* 120,51-56
- Colonna, P., Buleon, A. & Mercier, C. (1981). *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: structural studies of starches. *J. Food Sci.* 46, 88-93.





- 
- Cooke R. D., Twiddy D. R. & Reilly P. J. A. (1987). Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 369-379.
  - Cravioto, O. R., Cravioto, G., Massieu, H. & Guzman, J. (1955). El Pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte en la dieta. *Ciencia*, 15,27-30.
  - Dendy, David A. V., Dobraszczyk, Bogdan J., Cereales y productos derivados. Química y tecnología. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España, 2001. pags. 92-96
  - Diaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz Teran, F., Morlot, G. & Wachter-Rodarte, C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize beverage. *American Society Microbiology*. 69, 4367-4374.
  - Doublier J. L. & Choplin L. (1989). A rheological description of amylose gelation. *Carbohydrate Research*. 143 (1989), 215-22.
  - El maíz como alimento (en línea, disponible en <http://www.botanical-online.com/maizpropiedades.htm>; internet; accesado el 29 de septiembre del 2009)
  - FAOSTAT (en línea, disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>; internet; accesado el 29 de septiembre de 2009).
  - Fennema, O. R. (1993). Química de los Alimentos. ACRIBIA, S. A., 2ª ed. España, Zaragoza. pp. 130-137.
  - Flores Espinoza T. (1996), Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
  - Giraud, E., Brauman, A., Kekeke, S., Lelong, B. & Reimbault, M. (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology and Biotechnology*. 36,379-383.





- 
- Giraud, E., Gosselin L., Marin B., Parada J. L. y Raimbault M. (1993). Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology*. 75:276-282.
  - Giraud, E., Champailier, A. and Raimbault, M. (1994). Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*, *Applied and Environmental Microbiology*. 60,4319-4323.
  - Hall, B. M., Jennings, P. J., Lewis, A. B. & Robertson, B. J. (2000). Evaluation of starch analysis methods for feed samples. *Science of Food and Agriculture*. 81, 17-27.
  - Herrera, T., Ulloa, M. (1975). *Revisión Social Mexicana. Historia Natural* **24**, 423-457.
  - Jay, J. M. (1997). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. ACRIBIA, S. A., 3ª ed. España, Zaragoza. pp 442-449.
  - Hood, L. F. (1992). Current Concepts of Starch Structure. En *Food Carbohydrates*. Lineback, R. D. e Inglett, G. E. (eds). The Avi Publishing Company, Wesport, Connecticut, pp. 217-235.
  - Hulleman, S. H. D., Janssen, F. H. P. & Feil, H. (1998). The roler of water during plasticization of native starches. *Polymer*, 30 (10), 2043-2048.
  - Miles M. J., Morris V. J. & Ring S. G. (1984). Gelation of amylose. *Carbohydrate Research*. 135 (1985), 257-269.
  - Miles M. J., Morris V. J. & Ring S. G. (1984). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*. 135 (1985), 271-281.
  - Muller H. G. (1973). *Introducción a la Reología de los Alimentos*. ACRIBIA, Zaragoza, España. pp. 76-83.
  - Nagel J. G. & Lawrence, J. K. (1972). Simplified storage and retrieval of stock cultures. *Applied Microbiology*. 23 (4): 837-838.
  - Nout M. J., Sarkar P. K. (1999). Lactic acid food fermentation in tropical climates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76(1-4) 395-401.





- Nout M. J. R. & Motarjemi Y. (1997). Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. *Food Control* 8, 221-226.
- Nuraida, L. (1988). Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 237 pp.
- Nuraida, L., Wacher, M. C., Owens, J. D. (1995). Microbiology of pozol a Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 567-571.
- Oura, E., Suomalainen y Viskari, R. (1982). Breadmaking. En: *Fermented Foods*. A. H. Rose (Ed). *Economic Microbiology*, Vol. 7, Academic Press, Londres, pp 87-146.
- Paredes-López O., Harry G. I. (1988). Food biotechnology review: traditional solid-state fermentations of planta raw materials-application, nutritional significance, and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **27(3)**, 159-187.
- Parés, R. & Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté, Barcelona: 232-236.
- Ramirez J. F. (1987). Biochemical studies on a Mexican fermented corn food-pozol. PhD thesis, Faculty of the Graduate School, Cornell University, N. York, 176pp.
- Robelo, C. A. (1948). *Diccionario de Aztequismos*. Ediciones Fuente Cultural, México.
- Santillana, M. R. (1995). Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol. Tesis Maestría en Ciencias de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 87 pags.







- 
- Silvia-Villareal, E. C. (1984). Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, 44 pags.
  - Steinkraus K. H. (1983). Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals, and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49 (3), 337-348.
  - Téllez, D. A. Y. (2008). Cambios provocados por la fermentación sobre las propiedades viscoelásticas de la masa para pozol. Tesis Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 91 pags.
  - Steinkraus K. H. (1983). Lactic Acid Fermentation in the Production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49(3), 337, 348.
  - Ulloa, M. (1974). Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* **8**, 17-48.
  - Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. (1983), Mexican pozol. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Pags. 226-237. (Ed) K. H. Steinkraus, Vol 9. Microbiology Series. Marcel Dekker, Inc. New York y Basilea.
  - Ulloa, M., Herrera, T. & Lappe, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. *Serie de Investigaciones Sociales* **16**, pp 13-20.
  - Vargas, L. A. *Cuadernos de Nutrición* (1984) **4**, 18-32.
  - Vihinen Mauno, Mäntsälä Pekka (1989). *Microbial Amylolytic Enzymes*. Vol 24 Issue 4 329-415.
  - Wachter C., Cañas A., Cook P. E., Barzana E. and Owens J. D. (1993), Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9.2069-274.
  - Wachter, C., Urbina-Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. & Owens, D. (2000). Microbiology of indian and meztizo pozol fermentations, *Food Microbiol.* 17, 251-256.





- 
- Wang, H. L., Ruttel, D. I., & Hesseltine, C. W. (1981). Protein quality of wheat and soybean after *Rhizopus oligosporus* fermentation". J. Nutr., 96,109.
  - Wong Dominic W. S. Química de los alimentos: Mecanismos y teoría. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España, 1989. pags 140-142.





## APÉNDICE 1

### Preparación de reactivos y medios de cultivo

- Ácido dinitrosalicílico (DNS)

Para preparar este reactivo, se prepararon disoluciones separadas con los componentes mostrados en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Reactivos para preparar DNS

| Reactivo                | Cantidad | Reactivo                    | Cantidad |
|-------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| Agua destilada          | 35.5 mL  | Tartrato de sodio y potasio | 7.65 g   |
| Ácido dinitrosalicílico | 0.255 g  | Fenol                       | 0.19 mL  |
| Hidróxido de sodio      | 0.5 g    | Meta bisulfito de sodio     | 0.2075 g |

Posteriormente se mezclaron las dos disoluciones y la mezcla resultante se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente una semana antes de utilizarla.

- Ácido sulfúrico 12 N

Se preparó considerando lo siguiente:

Concentración inicial del ácido sulfúrico ( $C_i$ ): 18.46 N

Volumen de ácido 12 N requerido ( $V_f$ ): 500 mL

Concentración final requerida del ácido ( $C_f$ ): 12 N

Volumen requerido de ácido 18.46 N ( $V_i$ ) =  $V_f * C_f / C_i$

$$V = 500 \text{ mL} * 12 \text{ N} / 18.46 \text{ N} = 325.03 \text{ mL}$$

En la campana se colocaron aproximadamente 100 mL de agua en un matraz aforado de 500 mL en baño de hielo. Se agregaron 325.03 mL de ácido sulfúrico 18.46 N agitando y dejando estabilizar la disolución, se aforó con agua hasta 500 mL.





- Preparación de medios MRS, MRS-A, ACP y disolución salina al 0.85%

Para preparar un litro de medio MRS-A se pesaron los sustratos de la tabla A.2 y se disolvieron en agua destilada, se colocaron en matraces Erlenmeyer con un tapón de algodón y otro de aluminio y se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente en una campana de flujo laminar se colocaron en cajas Petri aproximadamente 15 mL de medio.

Los medios ACP (Oxoid) y MRS (Difco) ya están preparados, solo es necesario disolver la cantidad requerida en agua destilada y esterilizarlos.

Tabla A.2. Sustratos para preparar 1 L de agar MRS-A

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Peptona pancreática (Oxoid)       | 10 g    |
| Extracto de carne (Oxoid)         | 10 g    |
| Extracto de levadura (Oxoid)      | 5 g     |
| Almidón (J. I. Baker)             | 20 g    |
| Citrato diamoniacal (J. I. Baker) | 2.17 g  |
| Acetato de sodio (J. I. Baker)    | 5 g     |
| Sulfato de magnesio (Sigma)       | 0.207 g |
| Sulfato de manganeso (Sigma)      | 0.056 g |
| Fosfato dipotásico (Sigma)        | 2.62 g  |

Para preparar la disolución salina se pesaron 0.85 g de cloruro de sodio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Se colocaron 4.5, 9.0 y 10 mL respectivamente en tubos de vidrio con tapa y se esterilizaron.

Tanto los medios de cultivo como la solución salina se incubaron a 28 °C por 24 horas para comprobar esterilidad.

y se preparó la curva patrón de glucosa tal como se indica en la tabla A.3

- Curva patrón de glucosa

La curva patrón de glucosa que se utilizó en la determinación de azúcares reductores se preparó como se indica en la tabla A.3 y la regresión lineal se muestra en la figura A.1.





Tabla A.3. Datos de curva patrón de glucosa

|        | Sol stock de glucosa 0.2 mg/mL (mL) | Agua (mL) | Concentración (mg/mL) | Absorbancia a 540 nm |
|--------|-------------------------------------|-----------|-----------------------|----------------------|
| Blanco | 0.0                                 | 1.0       | 0.0                   | 0                    |
| 1      | 0.2                                 | 0.8       | 0.04                  | 0.012                |
| 2      | 0.4                                 | 0.6       | 0.08                  | 0.052                |
| 3      | 0.6                                 | 0.4       | 0.12                  | 0.089                |
| 4      | 0.8                                 | 0.2       | 0.16                  | 0.148                |
| 5      | 1.0                                 | 0.0       | 0.20                  | 0.184                |

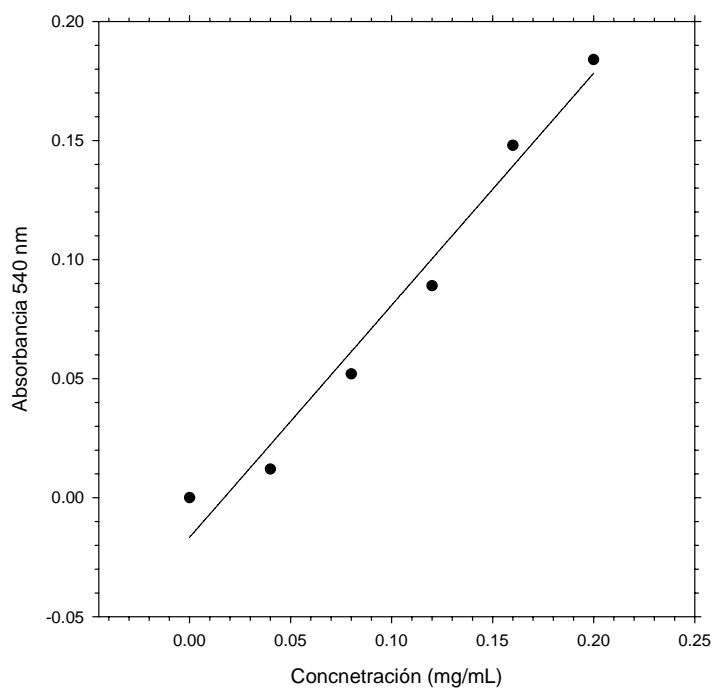


Figura A.1. Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla A.3. La línea continua es la regresión lineal  $Abs = 0.975C - 0.0167$  con  $r^2 = 0.9741$





## APÉNDICE 2

- Análisis de varianza de los resultados de los parámetros reológicos  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  de las dos fermentaciones realizadas.

Tabla A.4. ANOVA de  $G'$  de las masas control de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 1795670210        | 5                  | 359134042                 | 60.8974598 | 2.8967E-46   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 2.9976E+10        | 30                 | 999197849                 | 169.431476 | 5.281E-197   | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 61665846.7        | 150                | 411105.644                | 0.06971015 | 1            | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 2193816691        | 372                | 5897356.69                |            |              |                      |
| Total                     | 3.4027E+10        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.5. ANOVA de  $G'$  de las masas inoculadas de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 2183478902        | 5                  | 436695780                 | 71.6064765 | 2.3112E-52   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 2.832E+10         | 30                 | 943991754                 | 154.789504 | 2.92E-190    | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 65741420          | 150                | 438276.133                | 0.07186561 | 1            | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 2268661137        | 372                | 6098551.44                |            |              |                      |
| Total                     | 3.2838E+10        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.6. ANOVA de  $G''$  de las masas control de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 33303036.1        | 5                  | 6660607.22                | 68.0213383 | 2.2647E-50   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 2693929890        | 30                 | 89797663                  | 917.057111 | 0            | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 14938502.2        | 150                | 99590.015                 | 1.01706134 | 0.443105     | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 36426009.1        | 372                | 97919.3792                |            |              |                      |
| Total                     | 2778597437        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.7. ANOVA de  $G''$  de las masas inoculadas de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 31167090.3        | 5                  | 6233418.06                | 52.1956221 | 5.963E-41    | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 2496115966        | 30                 | 83203865.5                | 696.708848 | 1.285E-306   | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 22928520.5        | 150                | 152856.803                | 1.2799488  | 0.03200902   | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 44425785.7        | 372                | 119424.155                |            |              |                      |
| Total                     | 2594637363        | 557                |                           |            |              |                      |



Tabla A.8. ANOVA de tan  $\delta$  de las masas control de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 0.00024002        | 5                  | 4.8004E-05                | 3.70061101 | 0.00278781   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 0.43284249        | 30                 | 0.01442808                | 1112.25707 | 0            | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 0.00428893        | 150                | 2.8593E-05                | 2.20421525 | 6.8107E-10   | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 0.00482555        | 372                | 1.2972E-05                |            |              |                      |
| Total                     | 0.44219698        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.9. ANOVA de tan  $\delta$  de las masas inoculadas de la primera fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 0.00123546        | 5                  | 0.00024709                | 28.4369058 | 2.0395E-24   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 0.41144652        | 30                 | 0.01371488                | 1578.39024 | 0            | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 0.0116992         | 150                | 7.7995E-05                | 8.97609047 | 5.9725E-66   | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 0.00323237        | 372                | 8.6892E-06                |            |              |                      |
| Total                     | 0.42761355        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.10. ANOVA de G' de las masas control de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 9042667721        | 5                  | 1808533544                | 161.504161 | 6.6606E-91   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 6.8902E+10        | 30                 | 2296737092                | 205.101309 | 2.115E-211   | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 287386183         | 150                | 1915907.89                | 0.17109282 | 1            | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 4165678912        | 372                | 11198061.6                |            |              |                      |
| Total                     | 8.2398E+10        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.11. ANOVA de G' de las masas inoculadas de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 1.2972E+10        | 5                  | 2594370433                | 171.14911  | 3.9645E-94   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 5.9211E+10        | 30                 | 1973694837                | 130.203502 | 1.698E-177   | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 167288060         | 150                | 1115253.74                | 0.07357264 | 1            | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 5638976444        | 372                | 15158538.8                |            |              |                      |
| Total                     | 7.7989E+10        | 557                |                           |            |              |                      |



Tabla A.12. ANOVA de G<sup>2</sup> de las masas control de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 207831864         | 5                  | 41566372.8                | 197.83289  | 6.105E-101   | 2.23906227           |
| Frecuencia                | 4347839330        | 29                 | 149925494                 | 713.562234 | 1.41E-298    | 1.49911195           |
| Réplicas                  | 42713356.6        | 145                | 294574.873                | 1.40201309 | 0.00619545   | 1.249715             |
| Dentro del grupo          | 75639061.7        | 360                | 210108.505                |            |              |                      |
| Total                     | 4674023612        | 539                |                           |            |              |                      |

Tabla A.13. ANOVA de G<sup>2</sup> de las masas inoculadas de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 154447342         | 5                  | 30889468.3                | 77.8509258 | 1.0181E-55   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 4980955948        | 30                 | 166031865                 | 418.451178 | 1.935E-266   | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 99313255.4        | 150                | 662088.369                | 1.66866558 | 5.2108E-05   | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 147601099         | 372                | 396777.148                |            |              |                      |
| Total                     | 5382317644        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.14. ANOVA de tan  $\delta$  de las masas control de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 0.00014807        | 5                  | 2.9613E-05                | 2.79362655 | 0.01715705   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 0.27183324        | 30                 | 0.00906111                | 854.804585 | 0            | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 0.00216246        | 150                | 1.4416E-05                | 1.36001033 | 0.010412     | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 0.00394328        | 372                | 1.06E-05                  |            |              |                      |
| Total                     | 0.27808704        | 557                |                           |            |              |                      |

Tabla A.15. ANOVA de tan  $\delta$  de las masas inoculadas de la segunda fermentación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F          | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Días                      | 0.01096107        | 5                  | 0.00219221                | 299.64417  | 4.901E-128   | 2.23825225           |
| Frecuencia                | 0.34215949        | 30                 | 0.01140532                | 1558.94265 | 0            | 1.48994594           |
| Réplicas                  | 0.01563158        | 150                | 0.00010421                | 14.2440829 | 7.5495E-94   | 1.24520216           |
| Dentro del grupo          | 0.00272157        | 372                | 7.3161E-06                |            |              |                      |
| Total                     | 0.37147372        | 557                |                           |            |              |                      |







- Análisis de varianza de los resultados del contenido de almidón en los siete días de fermentación de las masas control e inoculadas.

Tabla A.16. ANOVA de contenido de almidón de las masas control de la segunda fermentación.

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| Días                             | 220,670339               | 5                         | 44,1340678                       | 5,04584136 | 0,01443502          | 3,32583738                  |
| Réplicas                         | 0,39655011               | 2                         | 0,19827506                       | 0,02266876 | 0,97763633          | 4,10281586                  |
| Error                            | 87,4662216               | 10                        | 8,74662216                       |            |                     |                             |
| Total                            | 308,533111               | 17                        |                                  |            |                     |                             |

Tabla A.17. ANOVA de contenido de almidón de las masas inoculadas de la segunda fermentación.

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| Días                             | 438,359226               | 5                         | 87,6718452                       | 8,15011615 | 0,00266343          | 3,32583738                  |
| Réplicas                         | 0,89606952               | 2                         | 0,44803476                       | 0,04165003 | 0,9593709           | 4,10281586                  |
| Error                            | 107,571283               | 10                        | 10,7571283                       |            |                     |                             |
| Total                            | 546,826579               | 17                        |                                  |            |                     |                             |





---

### APÉNDICE 3

#### **Detección de errores en el manual del kit STA20 Sigma-Aldrich, método amilasa/glucosidasa**

El instructivo del método enzimático (método amilasa/glucosidasa, kit STA20 Sigma-Aldrich), utilizado para la determinación del contenido de almidón en la masa a lo largo de la fermentación, presentó dos errores, los cuales originaron resultados erróneos e incoherentes, lo que llevo a hacer repeticiones hasta encontrar el origen del error y la obtención de resultados confiables.

Se encontró que la cantidad de muestra necesaria para la determinación de almidón recomendada e impresa en el instructivo del kit era diez veces superior a la que en realidad el método es capaz de determinar. Además, se detectó un error en la ecuación, impresa en el mismo instructivo, para calcular el contenido de almidón. El error consistió en que dicha ecuación contenía un factor 10 absolutamente innecesario. De no haber corregido el primer error, el contenido de almidón hubiese sido cada vez menor conforme aumentase la cantidad de muestra por examinar. De no haber corregido la ecuación, se hubiesen obtenido siempre contenidos de almidón superiores a 100%. Estas observaciones y correcciones fueron hechas del conocimiento de la compañía que comercializa el kit, la cual a su vez, agradeció las observaciones y reenvió el instructivo de este método corregido.

