



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CAMBIOS EN EL ESTADO FÍSICO DEL ALMIDÓN DURANTE LA
FERMENTACIÓN DE MASA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO PARA LA
PREPARACIÓN DE POZOL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MAURICIO CAMPOS MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL



Ciudad Universitaria, CD. MX

2023



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: Alberto Tecante Coronel

VOCAL: Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Aleida Mina Cetina

1er. SUPLENTE: Armando Conca Torres

2do. SUPLENTE: Roeb García Arrazola

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 313

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA:

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

SUSTENTANTE:

MAURICIO CAMPOS MARTÍNEZ

ÍNDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 ALIMENTO FERMENTADOS	3
1.1.1 Alimentos fermentados tradicionales.....	3
1.2 EL POZOL.....	3
1.2.1 Elaboración del pozol	4
1.2.2 Microbiología del pozol	4
1.3 FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA AMIOLÍTICA.....	5
1.3.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL)	6
1.3.2 Bacterias ácido-lácticas amilolíticas (BALA).....	7
1.3.2.1 Amilasas producidas por las BALA	7
1.4 EL ALMIDÓN.....	8
1.4.1 Amilosa	8
1.4.2 Amilopectina.....	9
1.4.3 Gránulo de almidón: estado físico.....	10
1.4.4 Gelatinización	12
1.4.5 Retrogradación	13
1.5 AMILASAS.....	14
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	16
2.1 Metodología general	16
2.2 Análisis fisicoquímico	17
2.2.1 Determinación de humedad	17
2.2.2 Determinación de pH	17
2.3 Análisis químico	18
2.3.1 Determinación del contenido de almidón	18
2.3.2 Determinación del contenido de amilosa.....	18

2.4 Análisis microscópico	20
2.4.1 Microscopía óptica y con filtro de luz polarizada.....	20
2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	20
2.5 Análisis térmico	20
2.6 Análisis con difracción de rayos X de polvos	21
2.7 Análisis del tamaño de partícula con difracción de rayo láser	21
2.8 Análisis Estadístico	22
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1 pH y almidón	23
3.2 Humedad y amilosa.....	25
3.3 Análisis térmico (μ DSC)	27
3.4 Microscopía	33
3.5 Difracción de rayos X.....	38
3.6 Tamaño de partícula y distribución de tamaños.....	41
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL:	bacterias ácido-lácticas
BALA:	bacterias ácido-lácticas amilolíticas
GP:	grado de polimerización
DMSO:	sulfóxido de dimetilo, por sus siglas en inglés
e.g.:	del latín <i>exempli gratia</i> , que significa, por ejemplo
i.e.:	del latín <i>id est</i> , que significa, esto es
Con A:	concanavalina A
MEB:	microscopía electrónica de barrido
DSC:	calorimetría diferencial de barrido, por sus siglas en inglés
μDSC:	microcalorimetría diferencial de barrido, por sus siglas en inglés

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas (Reddy *et al.*, 2007).
- Figura 2. Estructura química de la amilosa (a) y la amilopectina (b) (Wong, 2018).
- Figura 3. Representación esquemática del gránulo de almidón (Wong, 2018).
- Figura 4. Representación esquemática de los cambios que ocurren en la mezcla de almidón-agua durante el calentamiento, enfriamiento y almacenamiento (Wang *et al.*, 2015).
- Figura 5. Acción de las amilasas sobre la estructura química de la amilosa y la amilopectina (Gous & Fox, 2017).
- Figura 6. Reacciones que ocurren durante la determinación de almidón.
- Figura 7. Reacciones que ocurren durante la determinación de amilosa.
- Figura 8. Comportamiento del pH durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.
- Figura 9. Comportamiento del contenido de almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.
- Figura 10. Contenido de amilosa durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.
- Figura 11. Termogramas obtenidos a distintos días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.
- Figura 12. Termogramas obtenidos a distintos días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente.
- Figura 13. Imágenes de microscopía óptica de los gránulos de almidón observados con y sin filtro de luz polarizada durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico.
- Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de los gránulos de almidón observados con y sin filtro de luz polarizada durante la

fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico.

Figura 15. Imágenes de MEB de masa de maíz nixtamalizado sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Figura 16. Imágenes de MEB de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Figura 17. Patrones de difracción de rayos X de masa de maíz nixtamalizado sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Figura 18. Patrones de difracción de rayos X de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Figura 19. Distribución volumétrica del tamaño de partícula en masa de maíz nixtamalizado sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Figura 20. Distribución volumétrica del tamaño de partícula en masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Constantes de velocidad (k) de degradación del almidón en la masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.
- Cuadro 2. Contenido de humedad durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.
- Cuadro 3. Parámetros térmicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico.
- Cuadro 4. Parámetros térmicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico.
- Cuadro 5. Parámetros térmicos a los 25 días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.
- Cuadro 6. Tamaño promedio del gránulo de almidón obtenido mediante microscopía óptica durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.
- Cuadro 7. Grado de cristalinidad del gránulo de almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.
- Cuadro 8. Diámetro mediano durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

RESUMEN

En la masa de maíz nixtamalizado el principal componente disponible para la fermentación es el almidón, ya que durante la nixtamalización se reduce notablemente la cantidad de azúcares. Por lo tanto, la fermentación puede afectar la estructura química y física del almidón debido a la acción de las enzimas amilolíticas de las bacterias ácido-lácticas (BALA) presentes en la masa de maíz nixtamalizado.

Se estudió el estado físico del almidón de masas de maíz nixtamalizado con y sin tratamiento térmico previo, al inicio y durante la fermentación, mediante calorimetría diferencial de barrido, microscopía óptica y electrónica de barrido, análisis de tamaño de partícula con difracción de rayo láser, y difracción de rayos X en polvos. Además, durante la fermentación se monitoreó el pH, los contenidos de humedad, almidón y amilosa.

El monitoreo muestra disminución en el pH y el contenido de almidón durante la fermentación, mientras que el contenido de amilosa tiende a aumentar. La constante de velocidad de degradación del almidón es 30 % mayor durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente.

No se apreciaron cambios en la estabilidad térmica, y el tamaño del gránulo de almidón durante la fermentación. La birrefringencia, la morfología y la superficie del gránulo de almidón se ven afectadas después de 25 días de fermentación; y en el caso de la masa tratada térmicamente, los gránulos de almidón gelatinizados sufren cambios en su arquitectura. Por otro lado, la cristalinidad de los gránulos de almidón disminuye al término de la fermentación. Y la distribución del tamaño de partícula muestra desplazamientos en el intervalo de tamaño al final la fermentación.

ABSTRACT

In the nixtamalized maize dough, starch is the main component for fermentation since the quantity of sugars is significantly reduced during nixtamalization, i.e., alkaline cooking. Fermentation can affect starch's chemical and physical structure due to the action of amylolytic enzymes of the inherent lactic acid bacteria (LAB) in the dough of nixtamalized maize. Therefore, the physical state of starch in heat-treated and untreated nixtamalized maize dough at the beginning and during fermentation was studied by differential scanning calorimetry, scanning electron and light microscopy, particle size analysis by laser diffraction, and wide-angle X-ray diffraction. In addition, pH, moisture, starch, and amylose contents were monitored during fermentation.

Monitoring shows decreased pH and starch content during fermentation, while amylose content tends to increase. In addition, the starch degradation rate constant of heat-treated nixtamalized dough was 30 % higher during fermentation than that of the unheated dough.

No changes in thermal stability or the starch granule size were observed during fermentation. However, the starch granule's birefringence, morphology, and surface are affected at the end of 25-day fermentation. Fermentation of heat-treated dough resulted in changes in the structure of the gelatinized starch granules. On the other hand, the crystallinity of the starch granules decreases at the end of fermentation. Moreover, the particle size distribution undergoes shifts in the size range at the end of fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran naturalmente en los alimentos, de manera que, si se incuban en ciertas condiciones, e.g., en presencia o ausencia de aire a una temperatura determinada, se desarrollan ciertos grupos microbianos hasta alcanzar un número o una concentración elevados. Estos sistemas se conocen como alimentos fermentados. Durante su crecimiento en el alimento, los microorganismos modifican sus características sensoriales, como el sabor, el color y la textura. En el mundo existen gran cantidad de alimentos fermentados que se consumen en pequeñas regiones, que se conocen como alimentos fermentados tradicionales. La mayoría de estas fermentaciones son naturales, es decir, los microorganismos que participan se encuentran naturalmente en el sustrato (Guerrero *et al.*, 2014). El pozol es una bebida ácida obtenida de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado, producida en zonas rurales y urbanas del sureste de México (Díaz *et al.*, 2003). Durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado para la elaboración de pozol, las bacterias ácido-lácticas (BAL) son el grupo microbiano más importante, y las principales responsables de la acidificación (López *et al.*, 2017). Debido a la baja concentración de azúcares que queda en el maíz después de la nixtamalización, 0.1 a 0.7 g de sacarosa en 100 g de masa nixtamalizada seca, el almidón es un importante sustrato para la fermentación ácido-láctica (Díaz *et al.*, 2003). Además de las BAL, durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado, las bacterias ácido-lácticas amilolíticas (BALA) también juegan un papel importante porque producen enzimas amilolíticas que degradan el almidón y se producen carbohidratos más simples como glucosa y malto-oligosacáridos, que son fermentados en ácido láctico.

Por esta razón el almidón juega un papel importante durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado, ya que además de ser el principal carbohidrato disponible, el sabor y la textura, del alimento se ven afectadas por la degradación enzimática del almidón, la producción de ácido láctico, y la disminución de pH. Debido a la acción de las enzimas amilolíticas sobre el almidón, éste puede sufrir cambios en el estado físico durante la fermentación.

HIPÓTESIS

El almidón sufre cambios en su grado de cristalinidad, estabilidad térmica, morfología y tamaño del gránulo, durante el proceso de fermentación de masa de maíz nixtamalizado.

OBJETIVO GENERAL

Conocer los posibles cambios en el estado físico del almidón, durante la fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado, para saber si la acción de la actividad microbiana tiene influencia sobre dicho estado.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Tratar térmicamente la masa de maíz nixtamalizado previamente a la fermentación, para disponer también de un sustrato que contenga almidón gelatinizado, y examinar en él la acción de la actividad microbiana bajo las mismas condiciones de incubación usadas con la masa sin tratamiento térmico, en la cual el almidón no está gelatinizado.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

La presencia de los microorganismos en los alimentos no siempre causa daño. En realidad, sólo un pequeño porcentaje de los microorganismos asociados con los alimentos pueden causar alguna enfermedad o deterioro. Entre los microorganismos que causan beneficios, se encuentran aquellos que constituyen la microbiota. La fermentación consiste en la transformación del alimento, cereal, fruta, leche, entre otros, por la acción de microorganismos del medio ambiente, los cuales, al utilizar los componentes disponibles del alimento se reproducen. Esta transformación puede afectar el sabor, el color, el olor, la textura e incluso el valor nutrimental del alimento (Guerrero *et al.*, 2014; Wacher, 2014).

1.1.1 Alimentos fermentados tradicionales

En el mundo existen gran cantidad de alimentos fermentados que se consumen en pequeñas regiones, que se conocen como alimentos fermentados tradicionales. La mayoría de estas fermentaciones son naturales, es decir, los microorganismos que participan se encuentran de manera natural en el sustrato (Guerrero *et al.*, 2014).

1.2 EL POZOL

Es una bebida mexicana refrescante, no alcohólica y ácida, que consiste en la suspensión de masa de maíz nixtamalizado fermentada en agua. El origen del

pozol es maya y forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y sureste mexicano. El nombre del pozol proviene del náhuatl *pozolli*, que quiere decir espumoso (Wacher, 2014; López *et al.*, 2017). La concentración de mono- y disacáridos es reducida durante la nixtamalización, por lo tanto, el almidón es el principal carbohidrato disponible para la fermentación ácido-láctica (Díaz *et al.*, 2003).

1.2.1 Elaboración de pozol

La elaboración de pozol involucra varios pasos con importancia cada uno. Los pasos involucrados son: la selección del maíz a utilizar, blanco, amarillo o negro, la nixtamalización de los granos de maíz, el remojo y lavado de los granos nixtamalizados en agua fría, la molienda de los granos de maíz nixtamalizados, la formación de una masa de maíz martajado, i.e., molido a medias, con la que se forman bolas que se envuelven en hojas de plátano previamente flameadas para aumentar su elasticidad, las bolas de masa de maíz nixtamalizado se dejan fermentar durante un tiempo variable, horas o días, y la bebida se prepara suspendiendo la masa de maíz nixtamalizado fermentada en agua, en una relación masa: agua de 1:2 (Guerrero *et al.*, 2014; Wacher, 2014).

1.2.2 Microbiología del pozol

La mayoría de los microorganismos se introducen en la masa durante la molienda. El remojo es otra fuente de microorganismos, y otras etapas, como la superficie en la que se elaboran las bolas, el manejo con las manos y el aire, contribuyen en menor medida (Guerrero *et al.*, 2014).

En el pozol se encuentra una microbiota compleja compuesta por diferentes especies de bacterias, hongos y levaduras. Las BAL son el grupo microbiano

más importante durante la fermentación del pozol y las principales responsables de la acidificación; las bacterias del género *Streptococcus* constituyen 25 a 50 % de la microbiota, y también se han detectado *Lactobacillus pantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc* y *Weissella*. Mientras que las BALA proporcionan glucosa y malto-oligosacáridos para la comunidad microbiana. Las BALA que predominan son *Streptococcus bovis* (*S. infantarius* spp. *infantarius*), identificada como la principal, y además se identifican *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfurueus*. Algunas especies de levaduras y hongos que se encuentran siempre en muestras de pozol de diferentes lugares son *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida* que están siempre asociadas con el pozol en las primeras horas de la fermentación. Mohos como *Cladosporium cladosporoides* o *C. herbarum*, *Chrysonilia sitophila* y *Rhizopus arrhizus*, también se encuentran en la superficie de las bolas cuando se seca la superficie y el pH disminuye. El pozol contiene además bacterias como *Achromobacter pozolis* o *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes*, que tienen la particularidad de fijar el nitrógeno atmosférico, pudiendo ser responsables del alto contenido de proteína del pozol que resulta ser mayor al que se encuentra en la masa de maíz sin fermentar (Castillo *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2014; Wachter, 2014; López *et al.*, 2017).

1.3 FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA AMIOLÍTICA

La sacarosa es el principal azúcar soluble en el maíz; su concentración disminuye durante la nixtamalización de 2 g/100 g de grano entero en base seca, a 0.1-0.7 g/100 g de masa seca después de la cocción alcalina, remojo y lavado para obtener el nixtamal. El almidón es entonces el carbohidrato principal disponible para la fermentación ácido-láctica, y las bacterias ácido-lácticas amilolíticas (BALA) son esenciales al producir enzimas amilolíticas que

degradan al almidón en carbohidratos más simples que están disponibles para la producción de ácido láctico (Díaz *et al.*, 2003; Guerrero *et al.*, 2014; López *et al.*, 2017).

1.3.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Estas bacterias constituyen un grupo diverso de microorganismos Gram positivos, que son generalmente no esporulados, no móviles, catalasa negativos y anaerobios facultativos. Comprenden tanto cocos como bacilos que pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Lactococcus*. Las BAL producen ácido láctico como producto de la fermentación anaeróbica de la glicólisis. Se agrupan en homofermentativas y heterofermentativas de acuerdo con el producto final mayoritario (Figura 1).

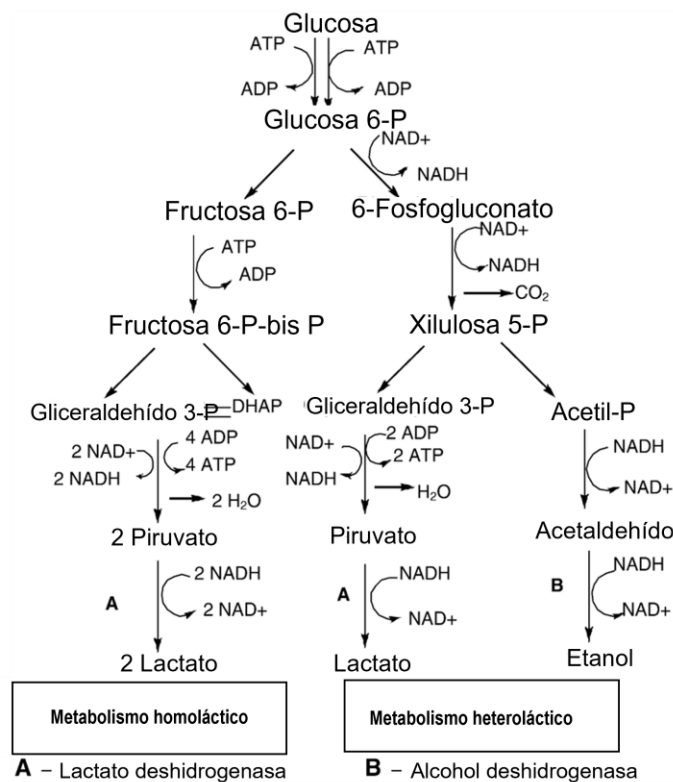


Figura 1. Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas (Reddy *et al.*, 2007).

Las homofermentativas poseen enzimas aldolasas y producen ácido láctico como producto mayoritario. Mientras que las heterofermentativas producen ácido acético, agua, etanol, junto con ácido láctico; por esta razón el rendimiento de ácido láctico alcanza solamente 0.5 g/g o 1.0 mol/mol de glucosa en promedio. Muchas BAL son consideradas seguras para la producción de ácido láctico y tienen una larga historia de uso en alimentos y bebidas, sin producir efectos adversos en la salud de los consumidores (Monet & Ray, 2016).

1.3.2 Bacterias ácido-lácticas amilolíticas (BALA)

Estos microorganismos pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella*. Las BALA producen enzimas, amilasas, que modifican el almidón, y poseen un amplio espectro de aplicaciones, en comparación con la hidrólisis química del almidón en la industria de alimentos. Las BALA se encuentran principalmente en alimentos amiláceos fermentados y cereales fermentados. Son capaces de convertir el almidón a mono- y disacáridos y hacerlos disponibles para la fermentación ácido-láctica. También pueden utilizar la biomasa amilácea y convertirla en ácido láctico en un solo paso (Reddy *et al.*, 2007; Monet & Ray, 2016).

1.3.2.1 Amilasas producidas por las BALA

Las enzimas que modifican el almidón de las BALA pertenecen a los grupos de α -amilasas, amilasas maltogénicas (MAAsas), amilopululaninas, pululaninas, neopululaninas, glicógeno fosforilasas y 1,6-glicosidasas. Las BALA presentes durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado producen las siguientes enzimas amilolíticas: α -amilasa (*L. lactis*, *S. bovis*, *S. macedonicus*,

E. sulfureus), pululanasa (*L. lactis*) y amilopululanasa (*L. lactis*) (Petrova *et al.*, 2013; Monet & Ray, 2016).

1.4 EL ALMIDÓN

Uno de los principales componentes de los alimentos es el almidón. Fuentes importantes son los cereales, las raíces y los tubérculos, y además es extraído de rizomas y troncos de árboles. También es utilizado en una amplia gama de alimentos como materia prima o aditivo, por lo tanto, juega un papel importante en los alimentos. Funciona como espesante, agente de relleno, absorbente de agua, fuente de energía en fermentaciones, entre otras funciones. Después de la celulosa, es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial (Badui, 2006; Eliasson, 2017).

La estructura química del almidón consiste predominantemente de α -glucano, en la forma de amilosa y amilopectina (Figura 2). La amilosa normalmente conforma 20-30 % y aún menos en los almidones cerosos. El almidón con alto contenido de amilosa puede contener más de 70 % de almidón. El almidón ceroso contiene ≥ 90 % de amilopectina. La amilosa y la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades sensoriales y reológicas de los alimentos, principalmente mediante su capacidad de hidratación y gelatinización (Badui, 2006; Petrova *et al.*, 2013; Wong, 2018).

1.4.1 Amilosa

Esta molécula consiste en una cadena lineal de 10^5 a 10^6 Da, con más de 4000 residuos glucosídicos unidos por enlaces α -1,4-glucosídicos (Figura 2a). La cadena lineal contiene dos a ocho puntos ramificados α -1,6 con cadenas de 4 a 100 unidades de glucosa de longitud. La amilosa contiene 99 % de enlaces

α -1,4, y 1 % de enlaces α -1,6. También tiene la facilidad de adoptar una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Badui, 2006; Petrova *et al.*, 2013; Wong, 2018).

La abundancia de grupos hidroxilo a lo largo de las moléculas de amilosa, imparte propiedades hidrofílicas al polímero, proporcionando afinidad por la humedad. Debido a su naturaleza lineal, movilidad, y la presencia de grupos hidroxilo, las moléculas de amilosa tienen la tendencia de orientarse a sí mismas de forma paralela y aproximarse unas con otras lo suficientemente cerca y permitir la unión por puentes de hidrógeno entre cadenas adyacentes (Cui, 2005).

1.4.2 Amilopectina

La amilopectina es una molécula de mayor tamaño comparada con la amilosa, con una masa molar de 10^7 a 10^9 Da y un grado de polimerización (GP) de 9500 a 16 000 unidades de glucosa. La molécula consta de 95 % de enlaces α -1,4 y 5 % de enlaces α -1,6 (Figura 2b). Está altamente ramificada, siendo formada de 2000-200 000 unidades de glucosa. En promedio, la amilopectina tiene un punto de ramificación cada 20 a 25 residuos (Cui 2005; Badui, 2006; Petrova *et al.*, 2013; Wong, 2018).

Las cadenas lineales ramificadas con GP de aproximadamente 15 en la amilopectina son las regiones cristalinas presentes en los gránulos. Estas pequeñas cadenas forman estructuras ordenadas en dobles hélices; parte de las dobles hélices pueden empacarse juntas en conformaciones organizadas en forma de racimo (clúster). La amilopectina tiene una estructura tipo racimo (clúster), con puntos de ramificación reunidos juntos hacia el extremo reductor. La estructura contiene tres tipos de cadenas de acuerdo con su longitud y puntos de ramificación: (1) Cadenas A conectadas solamente a

otras cadenas por enlaces α -1,6; (2) cadenas B conectadas a otra cadena e incluso ramificadas por cadenas A u otras cadenas B; y (3) una única cadena C que porta cadenas B y el extremo reductor de la molécula (Cui, 2005; Wong, 2018).

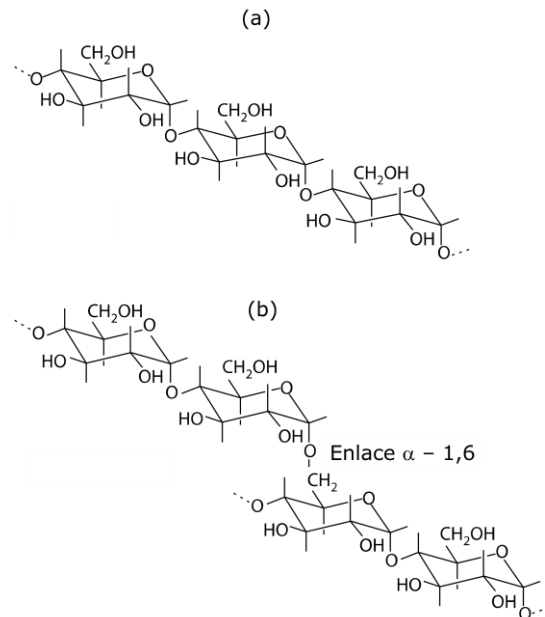


Figura 2. Estructura química de la amilosa (a) y la amilopectina (b) (Wong, 2018).

1.4.3 Gránulo de almidón: estado físico

El almidón sirve de reserva energética en el reino vegetal y se encuentra en pequeños corpúsculos discretos que reciben el nombre de gránulos. La estructura rígida de los gránulos está integrada por capas concéntricas de amilosa y amilopectina, distribuidas radialmente, empaçadas densamente con relativamente poca agua. Los gránulos de almidón tienen diámetros de 0.1 a 100 μm dependiendo del origen botánico y tienen diversas formas. La morfología puede ser esférica, poliédrica o lenticular, y el tamaño decrece desde la papa (< 110 μm), al trigo (< 30 μm), maíz (< 25 μm) y arroz (< 20 μm). Los gránulos son semicristalinos; la cristalinidad está alrededor de 15-45 %, y depende del origen botánico, la población de los gránulos y la

composición del almidón. Contienen regiones amorfas, cadenas cortas desordenadas, y cristalinas, dobles hélices ordenadas. La estructura cristalina de los diferentes almidones puede variar en el orden de empaque, teniendo así formas polimórficas, A en cereales, B en tubérculos y C una mezcla como en la tapioca, basadas en el patrón de difracción de rayos X (Badui, 2006; Matignon & Tecante, 2017; Wong, 2018).

Los gránulos de almidón son cuerpos birrefringentes, es decir, tienen dos índices de refracción, por lo cual cuando se irradian con luz polarizada desarrollan la típica "cruz de malta"; esto se debe a que dentro del gránulo se localizan zonas cristalinas de moléculas de amilopectina ordenadas paralelamente a través de puentes de hidrógeno, así como zonas amorfas causadas principalmente por la amilosa (Badui, 2006).

Desde el hilio, el cual es el punto inicial de crecimiento, el gránulo está organizado en capas concéntricas semicristalinas y amorfas o anillos crecientes (Figura 3), con espesor de 100 nm aproximadamente, organizados en un patrón alternado.

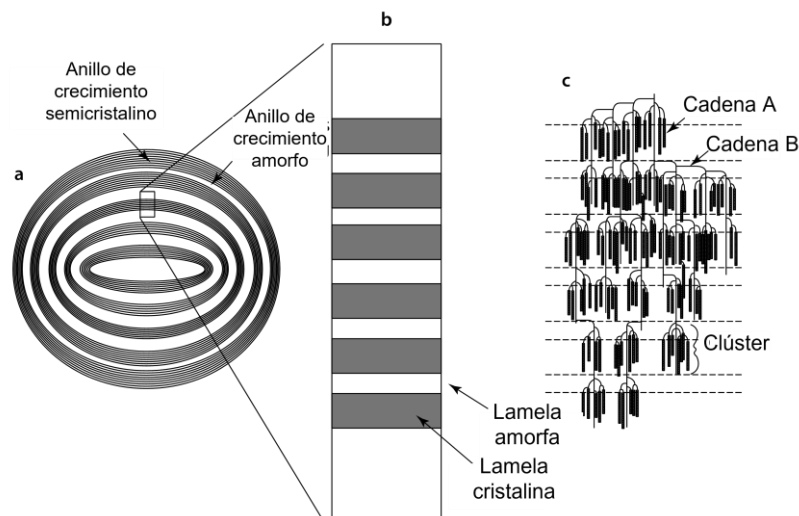


Figura 3. Representación esquemática del gránulo de almidón. **a** Un gránulo de almidón constituido por anillos concéntricos de capas amorfas y cristalinas alternadas. **b** Vista expandida de la estructura interna. **c** Estructura de racimo (clúster) de la amilopectina dentro del anillo creciente semicristalino (Wong, 2018).

Estos anillos están hechos de bloques, 2-500 nm en tamaño, que están compuestos por lamelas cristalinas y amorfas alternadas, con espesor de 10 nm. La lamela cristalina corresponde a los racimos de amilopectina y la lamela amorfa a los puntos de ramificación (Matignon & Tecante, 2017).

1.4.4 Gelatinización

Los carbohidratos complejos como el almidón nativo son poco digeribles sin un tratamiento térmico durante la producción de alimentos, provocando cambios estructurales deseados en el producto final. Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, debido a que su estructura está altamente organizada y a que presenta una gran estabilidad por las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos constituyentes, principalmente puentes de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilo. Durante el calentamiento del almidón en agua a cierta temperatura, normalmente cercana a 65 °C, los gránulos de almidón sufren un proceso llamado gelatinización. La gelatinización es provocada por varias operaciones en el procesamiento de los alimentos, como la extrusión en caliente de productos a base de cereales, el proceso de horneado del pan y pasteles, así como el cocimiento de salsa y rellenos, entre otras operaciones (Badui, 2006; Schirmer *et al.*, 2015; Eliasson, 2017).

Cuando el almidón es tratado térmicamente en agua, las interacciones entre la amilosa y la amilopectina sufren cambios que provocan modificaciones en la estructura del gránulo. El gránulo alcanza su volumen máximo y pierde su patrón de difracción de rayos X y la propiedad de birrefringencia; si se suministra más calor, el gránulo hinchado, incapacitado de retener el líquido, se rompe parcialmente y la amilosa y la amilopectina, fuertemente hidratadas se dispersan en el seno de la dispersión, provocando un aumento en la viscosidad. El almidón resultante consiste esencialmente en gránulos gelatinizados, hinchados, porosos, principalmente amilopectina, embebidos

dentro de una matriz de amilosa disuelta (Badui, 2006; Schirmer *et al.*, 2015; Wong, 2018).

1.4.5 Retrogradación

Cuando el almidón gelatinizado es enfriado y almacenado, cambia de un estado amorfo a un estado más ordenado cristalinamente, a esta re-formación de la estructura de doble hélice y cristalina se le llama retrogradación (Figura 4), y ocurre porque el almidón gelatinizado no está en equilibrio termodinámico.

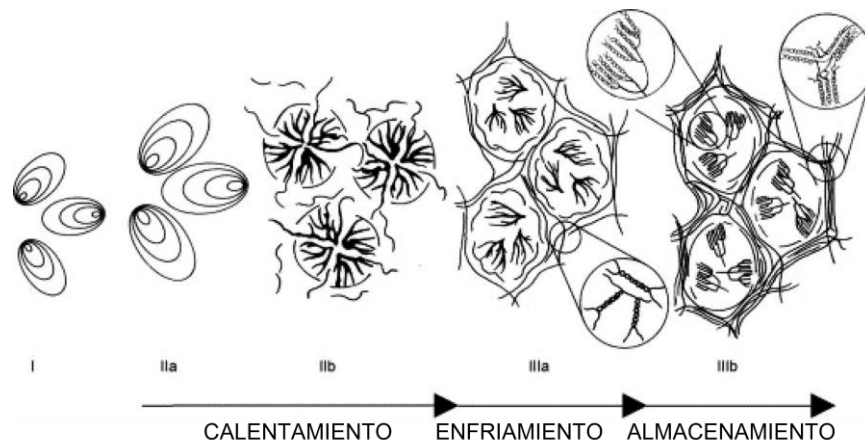


Figura 4. Representación esquemática de los cambios que ocurren en la mezcla de almidón-agua durante el calentamiento, enfriamiento y almacenamiento. (I) Gránulos de almidón nativos; (II) gelatinización, asociada con el hinchamiento [a] y la ruptura parcial del gránulo [b], resultando en la formación de una pasta de almidón; (III) retrogradación: formación de una red de amilosa (gelificación/retrogradación de la amilosa) durante el enfriamiento de la pasta de almidón [a] y la formación de moléculas ordenadas o cristalinas de amilopectina (retrogradación de la amilopectina) durante el almacenamiento [b] (Wang *et al.*, 2015).

El resultado es un cambio usualmente no aceptable en la calidad del producto, por ejemplo, cambios en las propiedades reológicas como un aumento en la firmeza o rigidez, o la pérdida en la capacidad de retención del agua, i.e., sinéresis. Las características como la estructura de la lamela, los anillos concéntricos, entre otras, que tiene el gránulo de almidón originalmente no se

recuperan, y por lo tanto la estructura es parcialmente ordenada. La retrogradación involucra la rápida re-cristalización de las moléculas de amilosa, seguida por una lenta re-cristalización de las moléculas de amilopeptina. La retrogradación de la amilosa determina la dureza inicial del gel. El desarrollo de la estructura del gel a largo plazo y la cristalinidad del almidón procesado, que están involucrados en el envejecimiento del pan y los pasteles, son atribuidos a la retrogradación de la amilopeptina (Wang *et al.*, 2015; Eliasson, 2017; Wong, 2018).

1.5 AMILASAS

Las amilasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos del almidón. Algunas enzimas con actividad amilolítica son: α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa y pululanasa. El ataque de la α -amilasa ocurre al interior de la molécula en los enlaces α -1,4, liberando 6-7 unidades de glucosa a partir de la amilosa; los productos resultantes de la actividad amilolítica tienen una configuración α . La β -amilasa cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4, efectuando remociones sucesivas de unidades de maltosa del extremo no reductor y resultando con configuración β ; en contraste con la amilosa, la amilopeptina no es completamente hidrolizada, ya que la reacción termina antes de alcanzar los puntos ramificados. En cuanto a la glucoamilasa, su actividad comienza en el extremo no reductor de los 1,4- α -D-glucanos y sucesivamente libera unidades de β -D-glucosa; en la amilopeptina los enlaces α -1,6 son rotos más lento que los α -1,4. La pululanasa hidroliza los enlaces α -1,6 glucosídicos formando fragmentos lineales de amilosa a partir de la amilopeptina (Hizukuri *et al.*, 2006; Belitz *et al.*, 2009; Taniguchi & Honda, 2009).

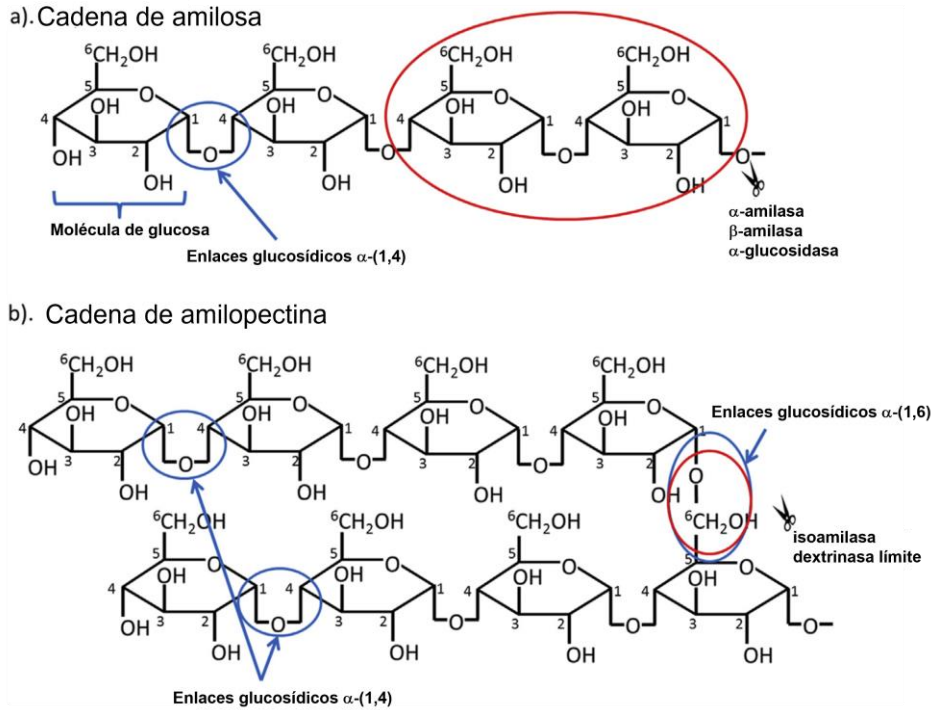


Figura 5. Acción de las amilasas sobre la estructura química de la amilosa y la amilopectina. a) Moléculas de glucosa unidas por enlaces α -(1,4) para formar amilosa la cual es cortada por la α -amilasa, la β -amilasa y la α -glucosidasa para formar maltosa (glucosa + glucosa) del extremo no reductor. b) Cadena de amilopectina formada por cadenas unidas por enlaces α -(1,4) y ramificaciones vía enlaces α -(1,6). Estas ramificaciones son cortadas por las enzimas desramificantes isoamilasa y dextrinasa límite, resultando en cadenas más cortas para ser hidrolizadas por α -amilasa y β -amilasa (Gous & Fox, 2017).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Metodología general

Se preparó masa de maíz nixtamalizado, mezclando harina de maíz nixtamalizado comercial (Maseca) con agua, utilizando las cantidades adecuadas para ajustar la humedad, a 60 g de agua en 100 g de masa de maíz nixtamalizado. Después, dos porciones de masa de 100 g cada una se colocaron por separado, en frascos de vidrio limpios y cerrados, y se incubaron a 30 °C durante siete y veinticinco días, respectivamente.

Otra masa de maíz nixtamalizado preparada de la misma manera se trató térmicamente, envuelta en papel aluminio, dentro de celdas cilíndricas metálicas cerradas con tapa de rosca, y se colocó cinta de teflón en la cuerda para favorecer la hermeticidad. El tratamiento térmico se llevó a cabo en un baño de agua destilada a 89 °C durante 30 min. La masa tratada térmicamente también se dividió en dos porciones de 100 g cada una, y cada porción se colocó por separado en frascos de vidrio limpios y cerrados, y se incubaron a 30 °C durante siete y veinticinco días, respectivamente.

Se tomaron muestras al tiempo cero, que correspondieron a la masa no fermentada, y durante los siguientes siete días de la fermentación para realizar el seguimiento con el tiempo. En el caso de las fermentaciones que duraron veinticinco días, se tomaron muestras durante los primeros siete días y al vigésimo quinto día la fermentación.

Al inicio y durante la fermentación se realizó el análisis fisicoquímico, análisis químico, análisis con microscopía óptica y el análisis térmico. Para el análisis con microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y tamaño de

partícula con difracción de rayo láser se utilizaron muestras al inicio y al término de la fermentación.

2.2 Análisis fisicoquímico

2.2.1 Determinación de humedad

Se determinó por triplicado mediante el método por secado en un horno de laboratorio (modelo HCF 45). Para la determinación se utilizó de 1.5 a 2.0 g de muestra y se colocó en una caja de aluminio previamente secada a 98-100 °C, enfriada en un desecador y pesada al alcanzar la temperatura ambiente. La muestra se secó a 98-100 °C durante dos horas, pasado ese tiempo se colocó la caja de aluminio tapada con la muestra seca en un desecador para que alcanzara la temperatura ambiente y se pesó. El contenido de humedad se determinó por diferencia entre la masa de muestra húmeda y seca (Método AOAC 925.10; Iturbe & Sandoval, 2013).

2.2.2 Determinación de pH

El pH se determinó por triplicado con un potenciómetro (Orion, modelo 420 A). Para la determinación se utilizó de 1.5 a 2.0 g de muestra, se suspendió en 20-30 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente con agitador magnético. Luego se sumergió el electrodo previamente calibrado en la suspensión acuosa, bajo agitación continua y se registró el valor indicado por el equipo (Método AOAC 943.02; Nielsen, 2017).

2.3 Análisis químico

2.3.1 Determinación del contenido de almidón

Se utilizó el Kit STA20 (Sigma-Aldrich), siguiendo la metodología indicada en el instructivo. El método consiste en la extracción de compuestos que causen interferencia, e.g., glucosa, con etanol al 80 %, la dispersión del almidón en sulfóxido de dimetilo (DMSO por sus siglas en inglés), la digestión del almidón con las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa, y la posterior cuantificación de la glucosa liberada espectrofotométricamente a 540 nm (Figura 6). La determinación se realizó por triplicado.

-Cálculo del contenido de almidón:

$$\text{Almidón} \left(\frac{g}{100 g \text{ muestra}} \right) = \frac{\Delta A \text{ prueba (900)}}{(\Delta A \text{ estándar})(mg \text{ de muestra})}$$

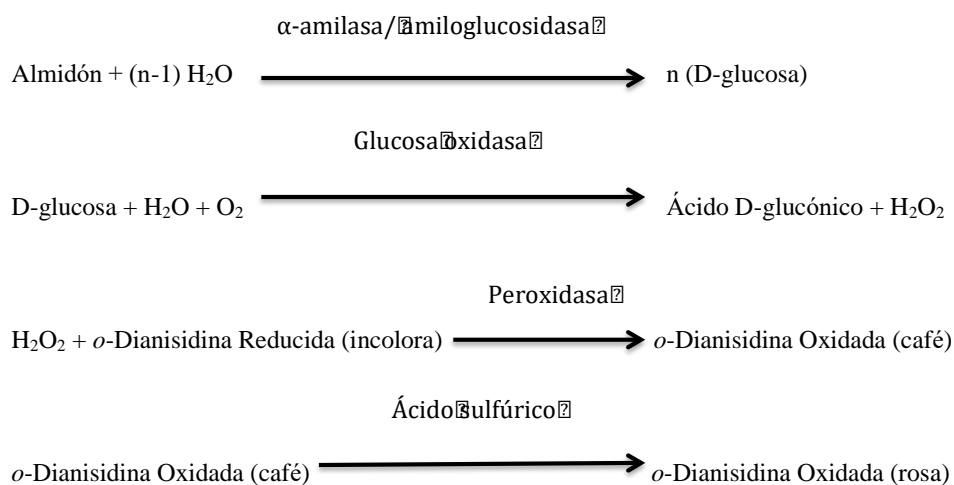


Figura 6. Reacciones que ocurren durante la determinación de almidón.

2.3.2 Determinación del contenido de amilosa

Se utilizó el Kit K-AMYL (Megazyme), siguiendo la metodología indicada en el instructivo. El método consiste en la dispersión con calentamiento de la

muestra de almidón en sulfóxido de dimetilo. Los lípidos son removidos mediante la precipitación del almidón en etanol y la recuperación del precipitado. Después de la disolución del precipitado en una solución de acetato de sodio, la amilopectina es específicamente precipitada con la adición de Concanavalina (Con A) y removida por centrifugación. La amilosa presente en una alícuota del sobrenadante es hidrolizada a D-glucosa, la cual es analizada utilizando un reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa. El almidón total, en una alícuota de la solución de acetato de sodio, es similarmente hidrolizado a D-glucosa, y es cuantificada colorimétricamente con glucosa oxidasa/peroxidasa. La concentración de amilosa en la muestra es estimada como, la relación de la absorbancia a 510 nm del sobrenadante de la Con A precipitada, y la absorbancia de la muestra de almidón total (Figura 7). La determinación se realizó por triplicado.

-Cálculo del contenido de amilosa:

$$\text{Amilosa} \left(\frac{g}{100 g \text{ almidón}} \right) = \frac{\text{Absorbancia (Con A sobrenadante)}}{\text{Absorbancia (alícuota almidón total)}} \times 66.8$$

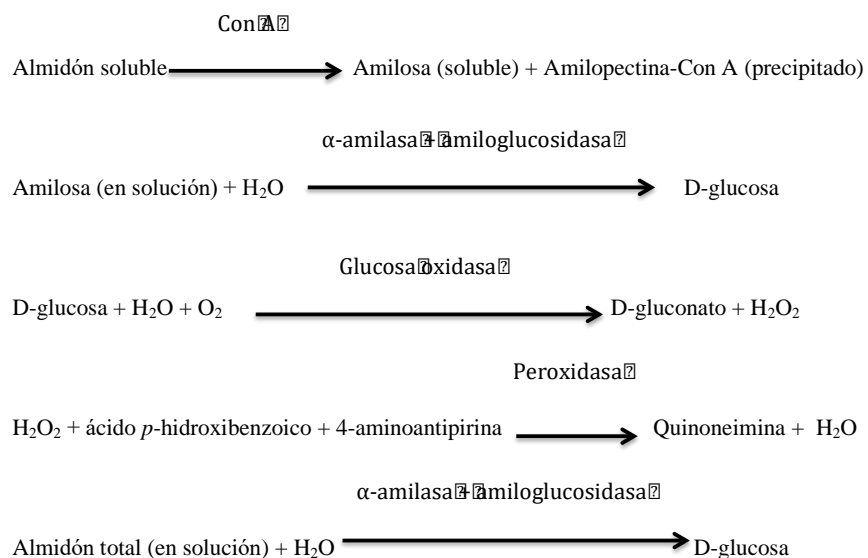


Figura 7. Reacciones que ocurren durante la determinación de amilosa.

2.4 Análisis microscópico

2.4.1 Microscopía óptica y con filtro de luz polarizada

Se preparó una suspensión de la masa de maíz nixtamalizado fermentada en agua (1:10), se colocaron dos gotas de la suspensión en un portaobjetos y se tiñó con una gota de solución de lugol diluida diez veces (Lees, 1982). La observación se realizó con un microscopio (Olympus modelo BX45, Japan) con cámara integrada, utilizando el objetivo 40x. También se utilizó un filtro de luz polarizada para observar la formación de la típica "cruz de malta". Las imágenes se analizaron y capturaron con el software Image-Pro® Plus The Proven Solution (versión 4.5 para Windows™). El tamaño promedio de los gránulos de almidón se determinó con el mismo software (Mabood *et al.*, 2011).

2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se examinó una porción de 600 mg de muestra en polvo, de la masa de maíz sin fermentar (día 0), y de la masa de maíz fermentada (día 7 y 25). El análisis se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-5900-LV (Jeol Co. Ltd., Japan). Las muestras secas fueron montadas en un soporte de aluminio, con base de carbono y cubiertas con oro. Las imágenes fueron obtenidas con el detector de electrones secundarios, utilizando un voltaje de 10 kV.

2.5 Análisis térmico

Se utilizó la técnica de microcalorimetría diferencial de barrido (μ DSC por sus siglas en inglés), con un equipo μ DSC 7 Evo (SETARAM, France). Se colocaron

entre 550 y 600 mg de muestra, en una celda y se cerró herméticamente. En la celda de referencia se colocó la misma cantidad de agua destilada. Las celdas se introdujeron en el horno del equipo, y se programó un ciclo de calentamiento-enfriamiento de 25 a 120 y 120 a 25 °C respectivamente, con una tasa constante de 1.2 K/min. Al finalizar la prueba, los resultados se analizaron con el software Calisto Processing (Ratnajake *et al.*, 2009; Pineda, 2010; Homer *et al.*, 2014).

2.6 Análisis con difracción de rayos X de polvos

Se examinaron 300 mg de muestra en polvo, de la masa de maíz sin fermentar (día 0), y de la masa de maíz fermentada (día 7 y 25). El análisis se llevó a cabo en un difractómetro de rayos X (modelo D8 Advance Davinvi). El análisis fue corrido en un intervalo de ángulos de difracción (2θ) de 3 a 40 °, por un tiempo de 30 min.

Los datos obtenidos se analizaron con el software Calisto Processing, para obtener el área de cada uno de los picos obtenidos, que en suma correspondieron al área total dispersada y el área de los picos de interés correspondieron al área cristalina.

-Cálculo del grado de cristalinidad:

$$Cristalinidad (\%) = \frac{\text{Área cristalina (picos)}}{\text{Área total (amorfa + cristalina)}}$$

2.7 Análisis del tamaño de partícula con difracción de rayo láser

Se examinaron 10 g de muestra en polvo, de la masa de maíz sin fermentar (día 0), y de la masa de maíz fermentada (día 7 y 25). El análisis se llevó a cabo en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments), equipado con un módulo de dispersión Hydro (2000MU, 2000S), y vía seca (Scirocco 2000). El

intervalo de tamaño utilizado fue de 0.02 a 2000 μm , el índice de refracción del dispersante (vía seca) fue de 1.330, y el índice de refracción de la muestra fue de 1.520. La absorción utilizada fue de 0.1.

2.8 Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con confiabilidad de 5 % ($\alpha = 0.05$), para establecer la diferencia significativa entre los valores obtenidos durante los días de la fermentación, para las determinaciones de pH, humedad, contenido de almidón, contenido de amilosa, y los parámetros térmicos.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 pH y almidón

El seguimiento con el tiempo de la fermentación muestra que el pH (Figura 8), y la concentración de almidón (Figura 9) disminuyen en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, y en la tratada térmicamente.

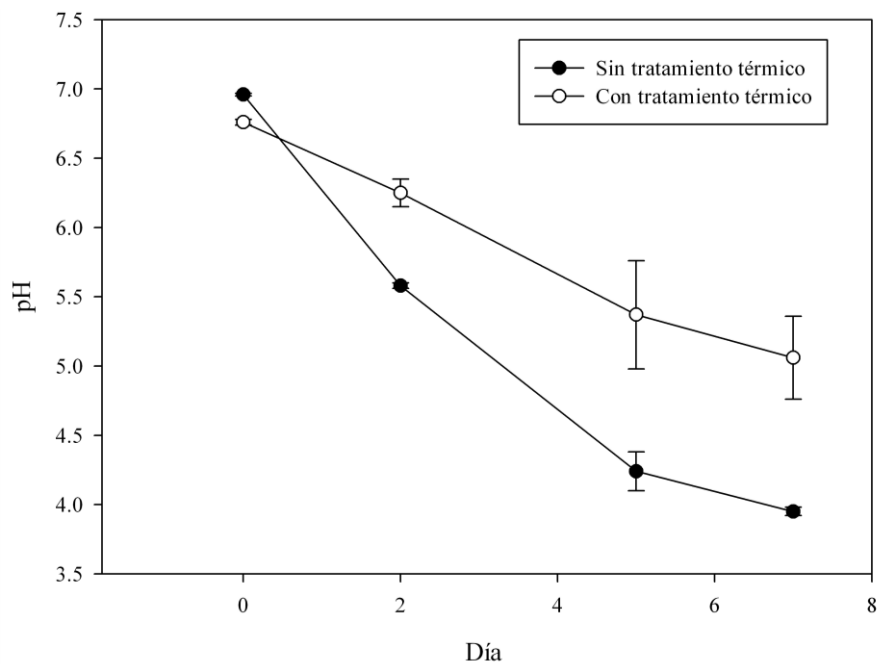


Figura 8. Comportamiento del pH durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.

El pH inicial en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico fue de 6.96 ± 0.01 , el valor disminuye a 3.95 ± 0.03 en el séptimo día de la fermentación, y a 3.99 ± 0.01 en el día veinticinco de la fermentación.

El descenso de pH se atribuye a la producción de ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido láctico, que pueden producirse durante la fermentación ácido-láctica (Reddy *et al.*, 2007; Petrova *et al.*, 2013), llevada a cabo por las

bacterias presentes naturalmente en masa de maíz nixtamalizado. Por ejemplo, las BAL, que se han reportado en estudios previos (Díaz et al., 2003; Castillo et al., 2005).

Mientras que el pH inicial en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente fue de 6.60 ± 0.14 , el valor disminuye a 5.46 ± 0.11 en el séptimo día, y a 4.69 ± 0.01 en el día veinticinco de la fermentación.

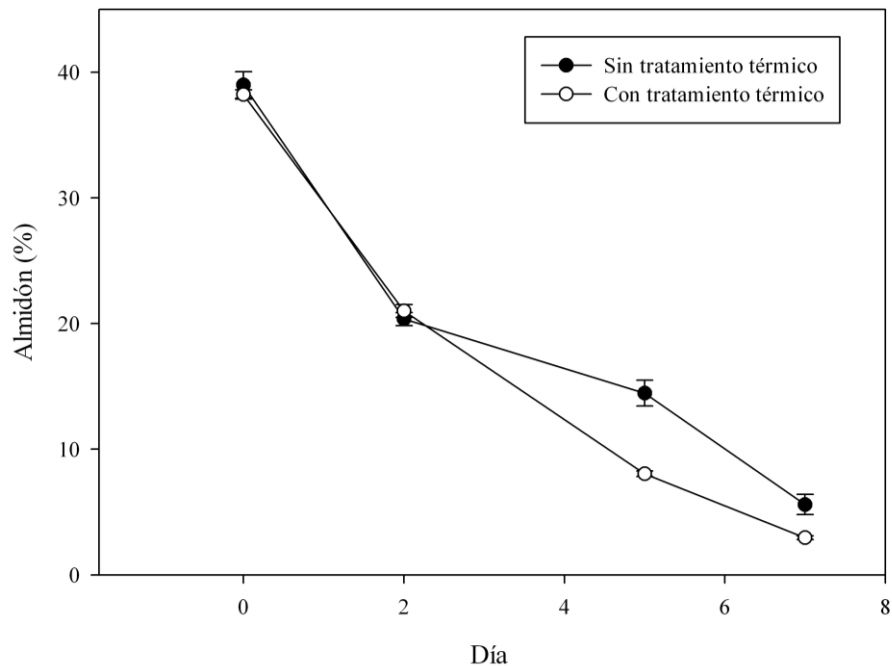


Figura 9. Comportamiento del contenido de almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.

El contenido de almidón inicial en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico fue de 38.98 ± 1.06 %, el valor disminuye a 6.51 ± 1.01 % en el séptimo día de la fermentación, y a 5.60 ± 0.81 % en el día veinticinco de la fermentación. El descenso en la concentración de almidón se atribuye a la acción de las enzimas amilolíticas, producidas por los microorganismos presentes de manera natural. Por ejemplo, las BALA, que cuya presencia se ha reportado en estudios previos (Díaz et al., 2003; Castillo et al., 2005).

Por otro lado, en la masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico el contenido de almidón inicial fue de $38.23 \pm 0.38 \%$, el valor disminuye a $4.18 \pm 0.55 \%$ en el séptimo día de la fermentación y a $2.96 \pm 0.15 \%$ en el día veinticinco de la fermentación.

Aunque durante el proceso de la masa de maíz nixtamalizado, con y sin tratamiento térmico ocurre una disminución evidente en el contenido de almidón, de acuerdo con las constantes de velocidad (Cuadro 1), la velocidad de degradación es 30 % mayor en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente.

Cuadro 1. Constantes de velocidad (k) de degradación del almidón en la masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

Tratamiento	Sin tratamiento térmico	Tratada térmicamente
Orden cinético	Primer orden	Primer orden
k (1/día)	0.2519	0.3584

Los gránulos de almidón sin gelatinizar son menos susceptibles a la acción enzimática que los gelatinizados (Apinan *et al.*, 2007; Uthumporn *et al.*, 2010). Esto se debe a que, en el gránulo no gelatinizado, la naturaleza semi-cristalina no se ha perdido, y por lo tanto las moléculas están de forma más compactada y el gránulo puede resistir mejor la actividad enzimática (Dhital *et al.*, 2015).

3.2 Humedad y amilosa

El contenido de agua tiene un papel importante, ya que el agua es un componente que puede interactuar con el almidón e influir en las propiedades fisicoquímicas del almidón, como por ejemplo en la temperatura gelatinización. Por esta razón se determinó el contenido de humedad, el cual no sufre cambios significativos durante las fermentaciones (Cuadro 2), por lo

que no se puede considerar como un factor que altere el estado físico del almidón.

Cuadro 2. Contenido de humedad durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

Día	Humedad (g/100 g)	
	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
0	61.71 ± 2.92 ^a	58.64 ± 0.05 ^a
2	61.45 ± 0.35 ^a	61.03 ± 2.53 ^a
5	61.03 ± 2.25 ^a	59.11 ± 0.96 ^a
7	60.05 ± 1.19 ^a	59.09 ± 1.94 ^a
25	59.09 ± 1.43 ^a	59.11 ± 0.77 ^a

^a Letras iguales en las columnas indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los valores.

El contenido de amilosa del almidón es importante, ya que junto con la amilopectina son los componentes principales, y por lo tanto influyen de manera importante en el estado físico del gránulo. Durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico el contenido de amilosa (Figura 10) del almidón residual, tiene a un aumento de 6 % a los siete días, y de 23 % a los veinticinco días con respecto al valor inicial. El contenido de amilosa disminuye el segundo día y vuelve a aumentar durante los demás días de la fermentación. Los aumentos se atribuyen a la producción de cadenas lineales como la amilosa (Yang *et al.*, 2017), resultantes de la acción de las enzimas de los microorganismos presentes de forma natural; por ejemplo, BALA que actúan sobre las ramificaciones de la amilopectina eliminándolas.

En cuanto a la masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico, el contenido de amilosa disminuye 0.25 % a los siete días, y aumenta 9 % a los veinticinco días, con respecto al valor inicial. En este caso hay un aumento en

el segundo día y posteriormente un descenso hasta el séptimo día y a los veinticinco días vuelve a aumentar.

El estado físico del almidón (gelatinizado o sin gelatinizar) influye de manera distinta en el comportamiento del contenido de amilosa durante el proceso, aunque al final en ambos casos, hay un aumento en el contenido de amilosa.

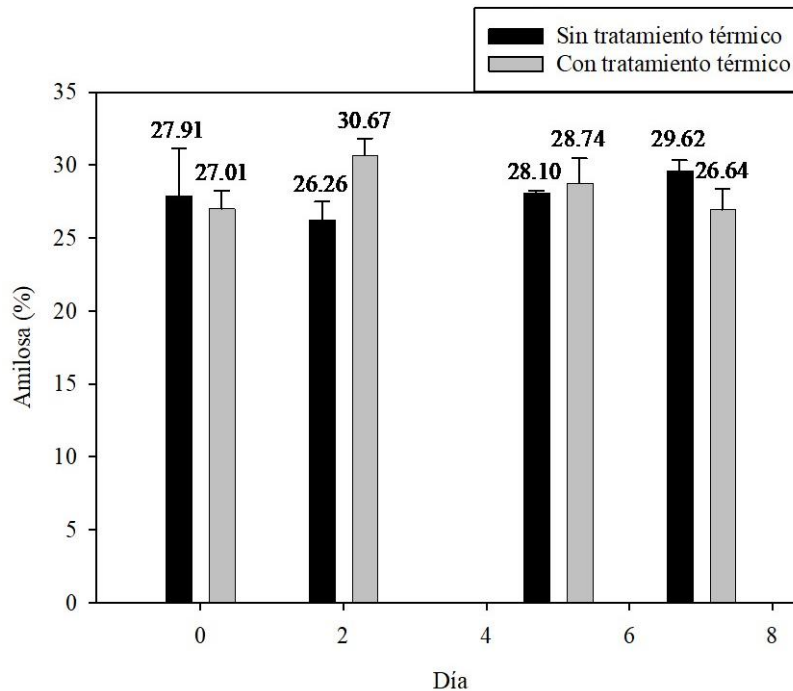


Figura 10. Contenido de amilosa (g de amilosa/100 g de muestra) durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

3.3 Análisis térmico (μ DSC)

Los termogramas de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico (Figura 11), muestran un pico endotérmico, el cual representa la transición que sufre el almidón durante el calentamiento. Dicha transición es la gelatinización de los gránulos de almidón (Coral *et al.*, 2009), presentes en la masa.

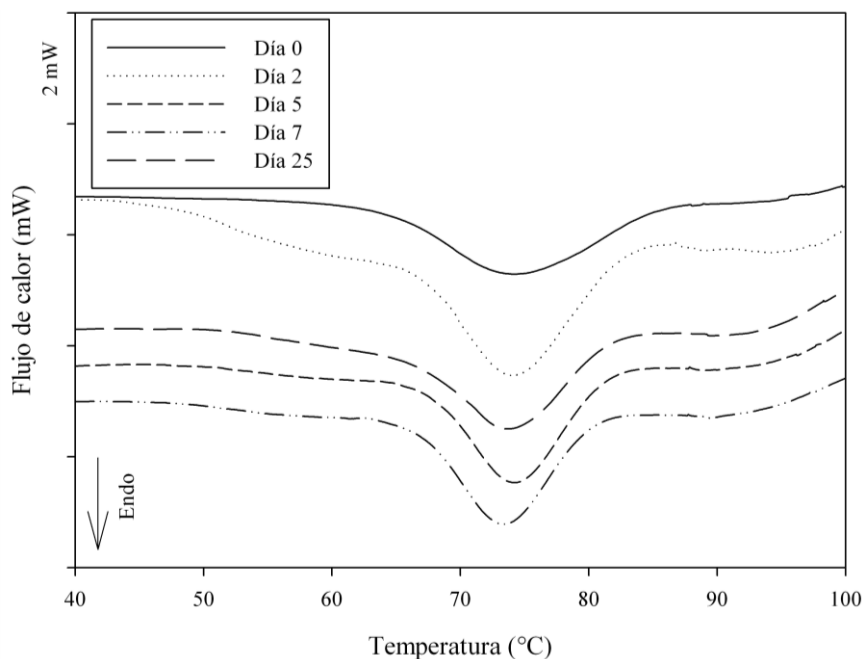


Figura 11. Termogramas obtenidos a distintos días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.

En el caso de la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente, los termogramas (Figura 12) también muestran un pico endotérmico en todos los días monitoreados, con excepción del día en el que la masa no está fermentada, debido al tratamiento térmico aplicado que provocó la gelatinización de los gránulos. El pico endotérmico observado en los termogramas de la masa de maíz nixtamalizado, a partir del segundo día es debido a la fusión del almidón retrogradado durante el almacenamiento y reposo.

Los valores de los parámetros térmicos, durante siete días de fermentación de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, no presentan diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 3). Esto indica que, no se afectó significativamente, la estabilidad térmica del almidón no gelatinizado presente, durante la fermentación.

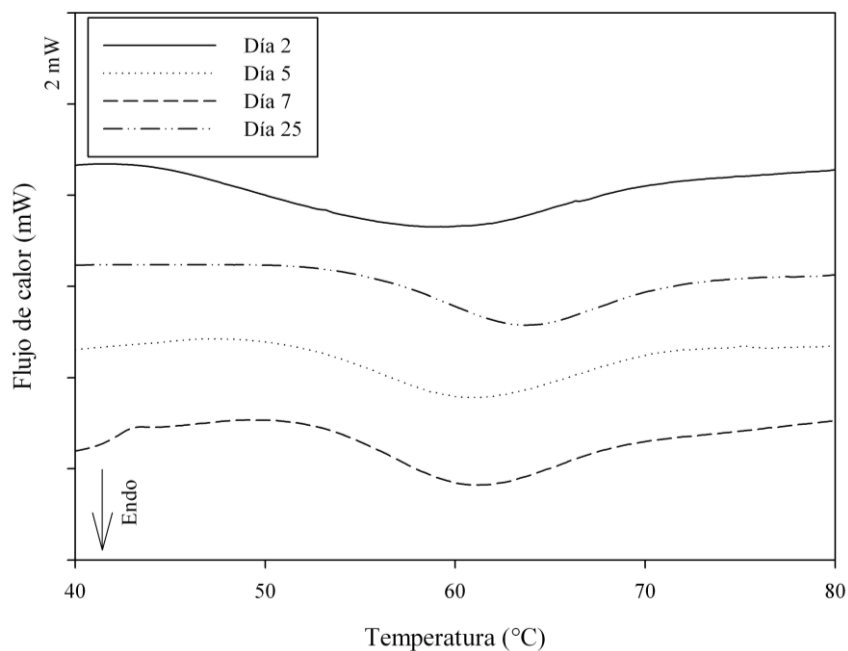


Figura 12. Termogramas obtenidos a distintos días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente.

La entalpía de gelatinización está asociada con la cantidad de cristales de amilopectina que fueron fusionados, y por lo tanto está ligada al orden interno del gránulo de almidón (Coral *et al.*, 2009, Reyes *et al.*, 2017). A pesar de que no se encontró diferencia significativa entre los valores de la entalpía de gelatinización, se observa que ésta tiende a aumentar durante la fermentación, teniendo al final un 22 % de aumento; indicando un mayor grado de estabilidad estructural de los gránulos de almidón y mayor resistencia a la gelatinización (Chaudhary *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Parámetros térmicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico.

Día	0	2	5	7
Entalpía gelatinización (J/g)	1.326 ± 0.165 ^a	1.529 ± 0.221 ^a	1.688 ± 0.217 ^a	1.693 ± 0.189 ^a
T _{pico} (gelatinización) (°C)	74.5 ± 0.257 ^a	73.9 ± 0.688 ^a	73.5 ± 0.903 ^a	73.3 ± 0.413 ^a
T inicial (°C)	64.0 ± 0.801 ^a	66.5 ± 1.02 ^a	65.8 ± 1.33 ^a	65.7 ± 0.886 ^a
T final (°C)	84.1 ± 3.42 ^a	84.2 ± 1.53 ^a	80.9 ± 0.495 ^a	81.1 ± 1.14 ^a

^a Letras iguales en las filas indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los valores.

Los datos de μ DSC proveen información sobre el arreglo molecular en el gránulo de almidón (Reyes *et al.*, 2017). El que no haya diferencia estadísticamente significativa entre los parámetros térmicos (Cuadro 3) durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado, indica que el proceso provoca cambios principalmente en la región amorfa del gránulo de almidón no gelatinizado, y tiene poco efecto sobre la región cristalina. La región amorfa está compuesta principalmente por amilosa y cadenas cortas de amilopectina (Yuan *et al.*, 2008); por lo tanto, las enzimas amilolíticas que pueden ser producidas por los microorganismos presentes naturalmente durante la fermentación, hidrolizan principalmente las cadenas de amilosa y cadenas cortas de amilopectina no ramificadas, porque son más simples en su estructura que las ramificadas de amilopectina, y por lo tanto son más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Reyes *et al.*, 2017).

Por otro lado, los valores de los parámetros térmicos durante siete días del proceso en la masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico (Cuadro 4), tampoco presentan diferencias estadísticamente significativas. En consecuencia, no se afecta la estabilidad térmica del almidón retrogradado. En este caso también son más susceptibles a la hidrólisis enzimática las cadenas de amilosa y las cadenas cortas de amilopectina no ramificadas. Después de que las cadenas cortas son hidrolizadas, la densidad de ramificación de amilopectina es menor, permitiendo que las cadenas largas tengan mayor movilidad, favoreciendo la retrogradación (Yuan *et al.*, 2008), evitando así que la estabilidad térmica del almidón retrogradado sea afectada. No obstante, la disminución de entalpía de transición es alrededor de 49 %, con respecto a la del almidón no gelatinizado; lo que muestra el efecto del tratamiento térmico sobre la masa. Asimismo, las temperaturas de transición son menores con respecto a las de la masa sin tratamiento térmico. Este comportamiento pudiera deberse a la gelatinización del almidón en el gránulo, pero también a la retrogradación de la amilopectina.

Cuadro 4. Parámetros térmicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico.

Día	0	2	5	7
Entalpía (J/g)	ND	0.682 ± 0.172 ^a	0.728 ± 0.084 ^a	0.651 ± 0.109 ^a
T _{pico} (°C)	ND	59.5 ± 1.58 ^a	61.5 ± 1.28 ^a	60.8 ± 0.642 ^a
T _{inicial} (°C)	ND	49.6 ± 2.06 ^a	56.0 ± 4.60 ^a	53.4 ± 0.265 ^a
T _{final} (°C)	ND	67.0 ± 1.58 ^a	68.5 ± 0.637 ^a	69.2 ± 1.27 ^a

^a Letras iguales en las filas indican que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los valores. ND = no determinada.

Tanto los geles de amilosa formados durante la retrogradación, y los cristales formados por recristalización de la amilopectina tienen una temperatura de fusión inferior a 100 °C (Wong, 2018), al igual que el almidón retrogradado, presente en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente (Cuadro 4). La entalpía tiene un valor inferior al de la gelatinización del almidón, esto se debe a que el almidón retrogradado no tiene la misma estabilidad, y su estructura no es tan ordenada como en el almidón gelatinizado.

Durante la fermentación, se pueden producir carbohidratos de cadena más corta, principalmente maltosa y glucosa, por acción de las enzimas producidas por los microorganismos presentes naturalmente, por ejemplo, BALA. Dichos azúcares pueden tener efecto sobre las propiedades térmicas del almidón no gelatinizado, ya que reducen la velocidad de gelatinización y por lo tanto provocan un aumento en la temperatura de gelatinización (Badui, 2006; Eliasson, 2017). Dicho comportamiento ha sido observado en estudios con mezclas de almidón, con distintas concentraciones de azúcares como la trehalosa, glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, entre otros (Perry y Donald, 2001; Babić *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015).

Por lo tanto, los azúcares producidos durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico pueden evitar que la velocidad de gelatinización aumente, y los parámetros térmicos no se vean afectados. Además, la estabilidad del almidón no gelatinizado mejora al aumentar la

entalpía de gelatinización. En cuanto al efecto de los azúcares sobre la retrogradación de almidón, estudios con glucosa, trehalosa, fructosa, entre otros azúcares (Babić *et al.*, 2009) también muestran un efecto sobre las propiedades térmicas del almidón retrogradado, provocando una reducción en la velocidad de retrogradación. Se sabe que el efecto de los azúcares sobre la gelatinización y retrogradación del almidón de maíz varía significativamente según el azúcar añadido.

Los valores de los parámetros térmicos a los 25 días de la fermentación (Cuadro 5) del almidón no gelatinizado presente en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, presentan una diferencia con respecto al valor del séptimo día (Cuadro 3) de la fermentación, de 8 % en la entalpía, 0.53 % en la temperatura pico, 0.04 % en la temperatura de inicio, y 7 % en la temperatura final. A pesar de que la masa de maíz nixtamalizado se dejó fermentar durante más tiempo, aún no se aprecia un efecto evidente, sobre la estabilidad térmica del almidón no gelatinizado.

Cuadro 5. Parámetros térmicos a los 25 días de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

Parámetro térmico	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Entalpía (J/g)	1.842	0.583
T _{pico} (°C)	73.694	63.554
T _{inicial} (°C)	65.672	55.499
T _{final} (°C)	87.329	72.086

Por otra parte, los valores de los parámetros térmicos a los 25 días del proceso (Cuadro 5), del almidón presente en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente, muestran un aumento de 10 % en la entalpía, 4 % en la temperatura pico, 4 % en la temperatura de inicio y 4 % en la temperatura final, con respecto al valor del séptimo día (Cuadro 4) de la fermentación. La

estabilidad térmica del almidón retrogradado no es afectada de manera evidente, a pesar de que se observa un aumento en los parámetros térmicos.

3.4 Microscopía

Los gránulos de almidón presentes en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, y sin fermentar, presentan una morfología elíptica o lenticular, típica de los gránulos nativos de almidón de maíz, y al colocar el filtro de luz polarizada se observa la formación de la típica "cruz de malta" (Figura 13), indicando que el gránulo tiene una orientación radial en sus cristales o que existe un alto orden molecular (Cui, 2005).

En las imágenes de microscopía óptica tomadas a los siete días de la fermentación (Figura 13), no se observan cambios en la morfología de los gránulos de almidón. Al utilizar el filtro de luz polarizada se observó la típica "cruz de malta", atribuida a la birrefringencia de las zonas cristalinas de amilopectina (Badui, 2006); su presencia indica que aún hay gránulos que no fueron afectados en su estado físico durante la fermentación.

A los 25 días aún se observan gránulos de almidón con la misma morfología, pero la apariencia semi-cristalina ya no es tan evidente. Al colocar el filtro de luz polarizada, ya no se observa la formación de la típica "cruz de malta", lo que indica que la naturaleza semi-cristalina de los gránulos de almidón ha sido afectada.

El tamaño promedio de los gránulos de almidón (Cuadro 6), se mantuvo en el intervalo de 14-16 μm , el cual está dentro del intervalo típico de 5-25 μm para los gránulos nativos de almidón de maíz (Badui, 2006; Belitz, 2009).

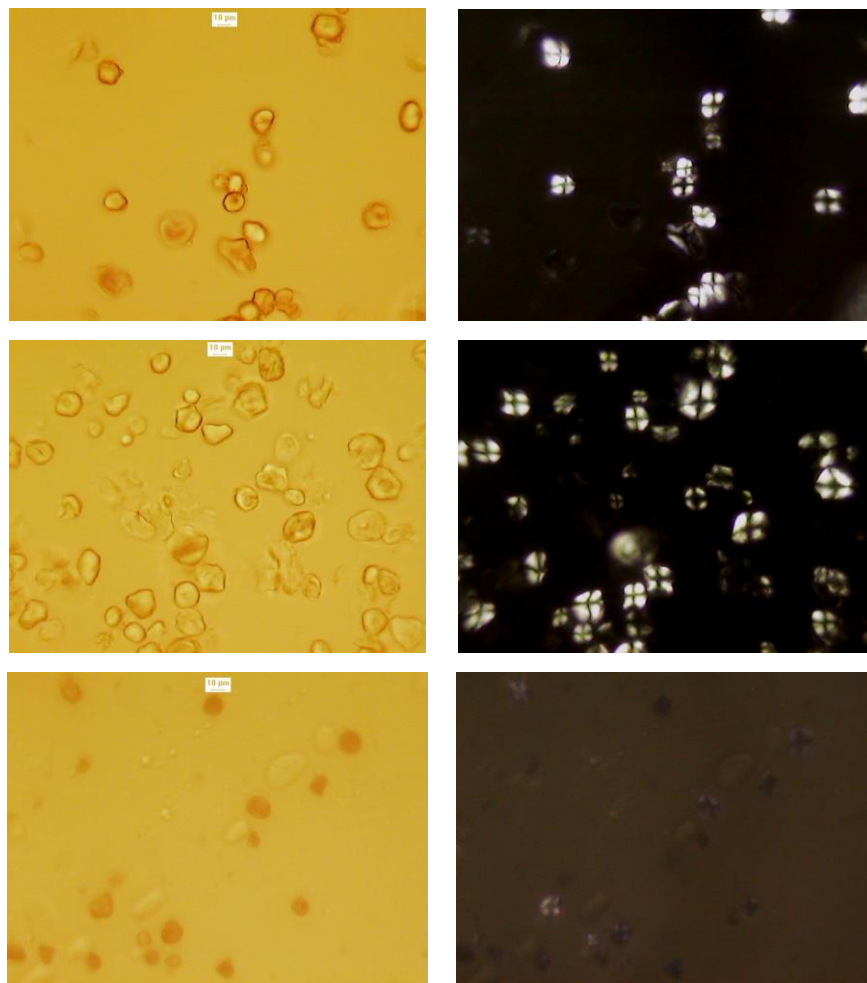


Figura 13. Imágenes de microscopía óptica de los gránulos de almidón observados (40X), sin (izquierda) y con (derecha) filtro de luz polarizada durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico. Sin fermentar (arriba), en el día 7 (en medio) y en el día 25 (abajo). El marcador indica 10 μm .

Cuadro 6. Tamaño promedio del gránulo de almidón obtenido mediante microscopía óptica durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado.

Día	Tamaño promedio de los gránulos de almidón (μm)
0	15.12 ± 3.00
1	15.64 ± 2.79
6	14.29 ± 2.96
7	15.33 ± 3.45
25	16.23 ± 4.02

Las imágenes de microscopía óptica de los gránulos de almidón presentes en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente (Figura 14), muestran el efecto del calentamiento ya que los gránulos han perdido la morfología típica que tienen cuando están intactos, y al colocar el filtro de luz polarizada ya no se observa la formación de la típica "cruz de malta", debido a que el orden cristalino de los gránulos de almidón se perdió durante el calentamiento.

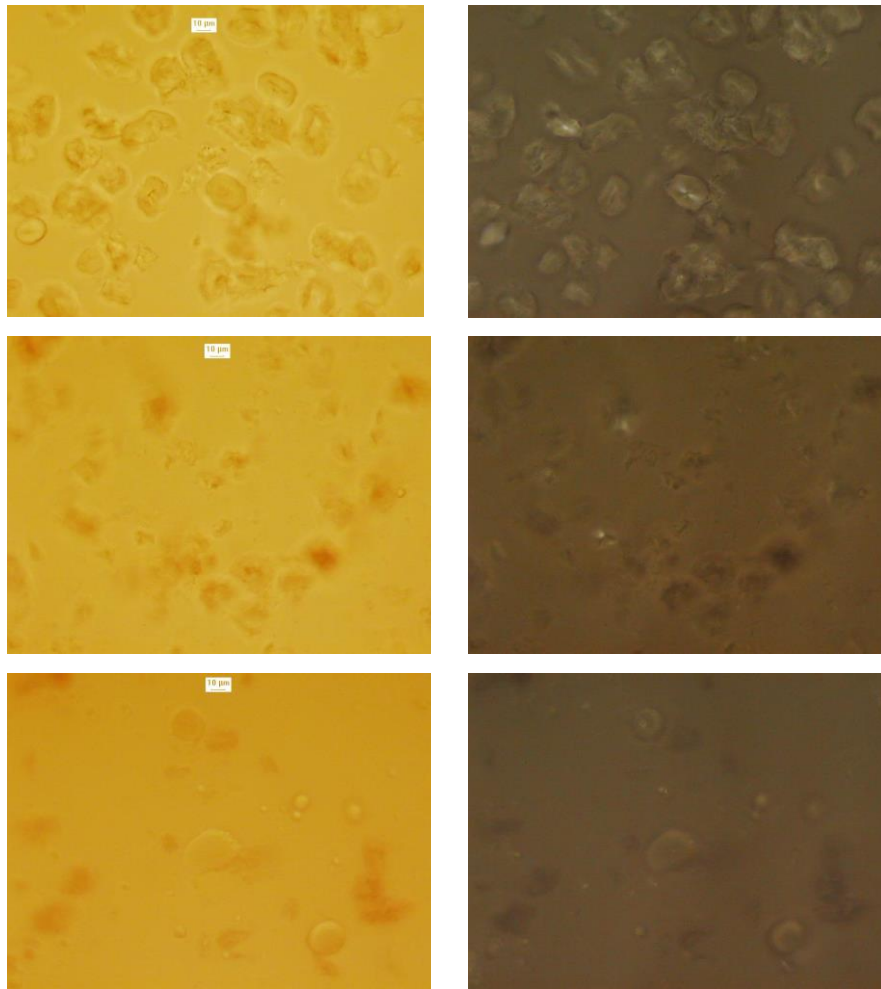


Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de los gránulos de almidón observados (40X) sin (izquierda) y con (derecha) filtro de luz polarizada durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico. Sin fermentar (arriba), en el día 7 (en medio) y en el día 25 (abajo). El marcador indica 10 μm .

En las imágenes de MEB (Figura 15), se observa la presencia de gránulos de almidón en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico sin fermentar, y en la fermentada durante siete días. Los gránulos tienen una superficie lisa, sin poros o alguna hendidura visible. Su morfología es esférica o elíptica.

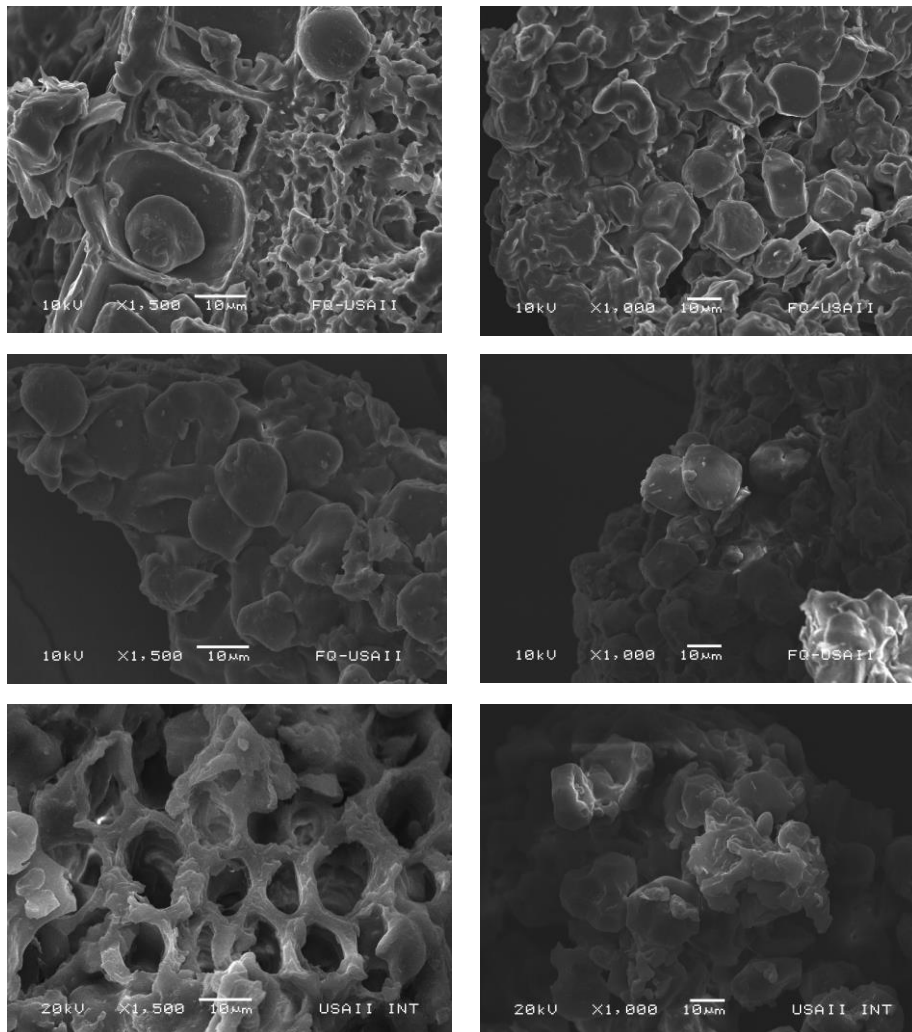


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de masa de maíz nixtamalizado sin fermentar (arriba) y fermentada durante 7 (en medio) y 25 (abajo) días. La masa no fue tratada térmicamente. La barra de escala indica 10 µm.

En la masa fermentada por siete días, se observan gránulos intactos, sin daños visibles en su superficie durante la fermentación. Sin embargo, a 25 días los gránulos ya no se observan intactos. Los gránulos en su mayoría ya no son

esféricos o elípticos, lo que sugiere que la fermentación afectó de manera más evidente la morfología de los gránulos de almidón.

En la Figura 16, se muestra el efecto del tratamiento térmico aplicado a la masa de maíz nixtamalizado.

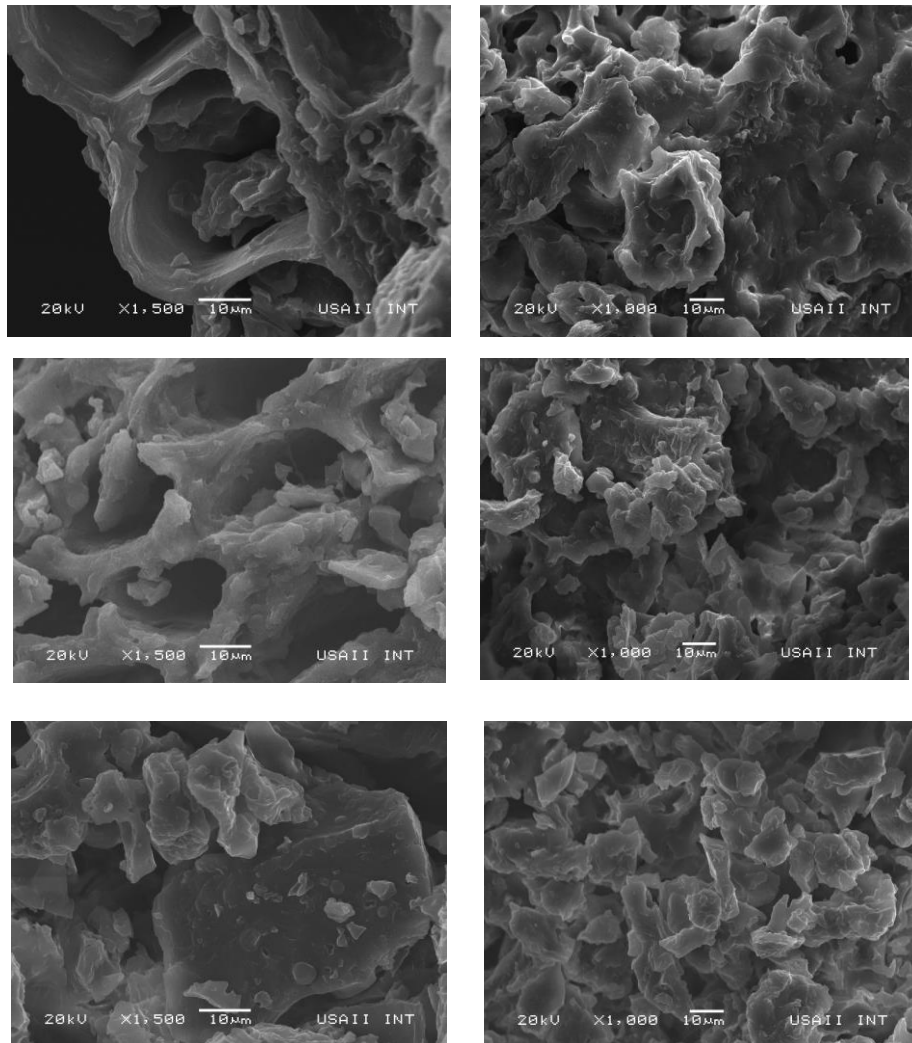


Figura 16. Imágenes de MEB obtenidas de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar (arriba) y fermentada durante 7 (en medio) y 25 días (abajo). La barra de escala indica 10 µm.

No se observan estructuras identificables o típicas de gránulos de almidón, debido a que el calentamiento provocó su disrupción al gelatinizarse el almidón. En consecuencia, se formó una matriz o red provocada por la salida de la amilosa y amilopectina de los gránulos de almidón. A los siete, y

veinticinco días de la fermentación se observan pequeñas estructuras con morfología irregular, las cuales se aprecian más claramente a los veinticinco días. Estas estructuras ocurren probablemente porque la matriz o red que se observa inicialmente fue degradada durante la fermentación.

3.5 Difracción de rayos X

El patrón de difracción observado para el almidón, de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, sin fermentar y fermentada durante siete días (Figura 17), presenta los picos esperados para el almidón nativo de maíz. El patrón típico corresponde a los cristales tipo A, con picos en 2θ para 15, 17, 18 y 23°.

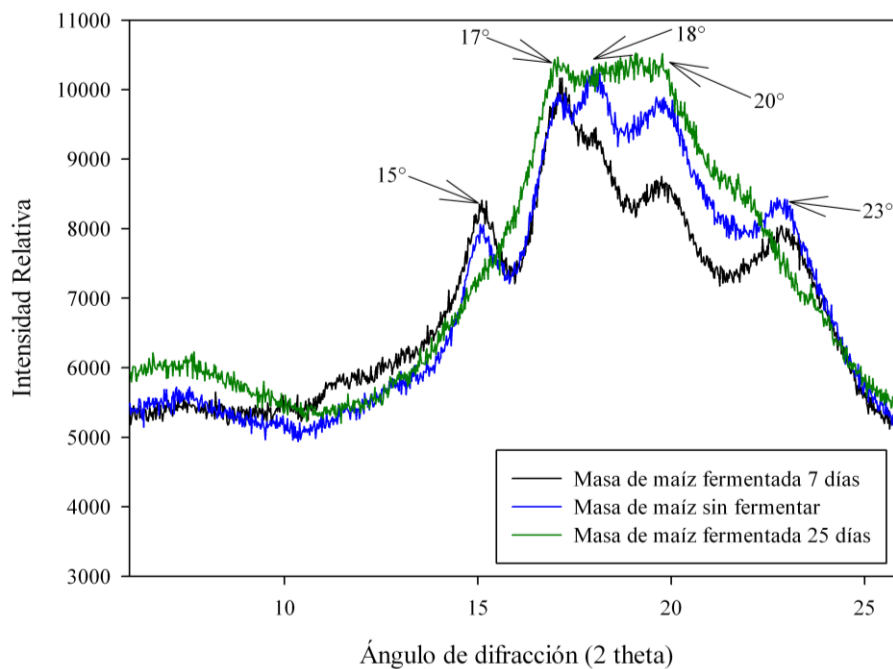


Figura 17. Patrones de difracción de rayos X de masa de maíz nixtamalizado sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

El pico a 20° es típico para los cristales tipo V, que aparecen debido a la formación de complejos de inclusión, entre la amilosa y los lípidos del almidón.

Se ha reportado la formación de este tipo de complejos, durante la nixtamalización, y el remojo debido a la gelatinización parcial durante el calentamiento (Santiago *et al.*, 2017).

En el caso de la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente, el patrón de difracción (Figura 18) presenta solamente tres picos en 2θ para 5° , 17° y 20° , debido a que durante el calentamiento el almidón fue gelatinizado parcialmente. A los siete días de la fermentación, los picos para 17° y 20° , muestran un aumento en la intensidad, y se observa un pico pequeño para 23° . El patrón de difracción corresponde al almidón retrogradado durante el reposo, con algunos picos típicos de los cristales tipo B (Cui, 2005; Eliasson, 2017) y el pico a 20° típico de los cristales tipo V.

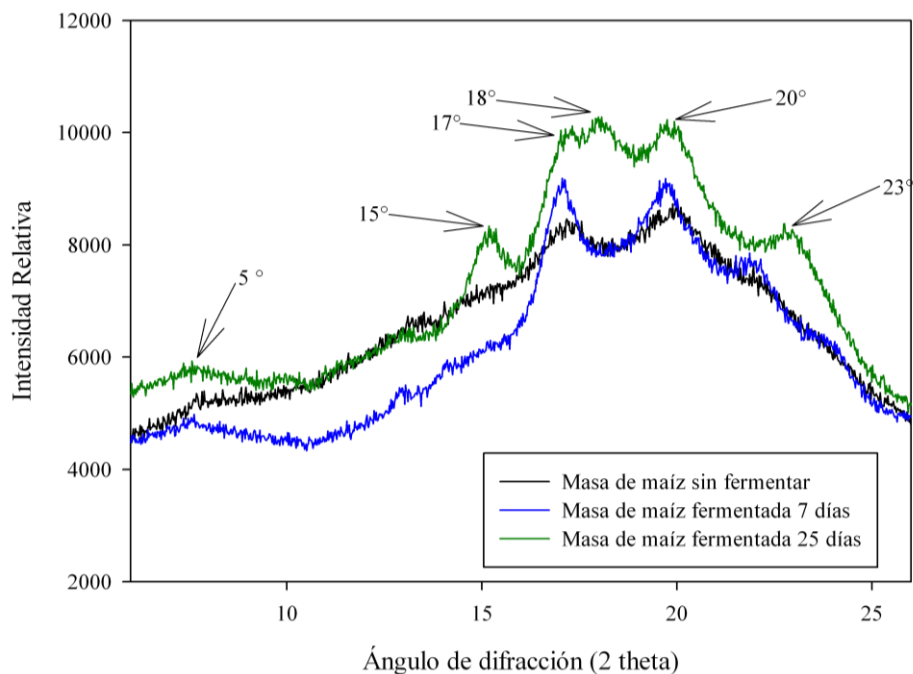


Figura 18. Patrones de difracción de rayos X de masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

La cristalinidad del gránulo de almidón nativo es alrededor de 15-45 %, debido a su naturaleza semi-cristalina (Matignon & Tecante, 2017). En la masa de maíz nixtamalizado utilizada, la cristalinidad fue 7.87 %, sin tratamiento, y

sin fermentar. Esta cristalinidad es menor que la reportada en la literatura, debido al tratamiento térmico alcalino o nixtamalización, el cual consiste en cocer los granos de maíz con hidróxido de calcio de baja pureza (cal), durante aproximadamente 90 min (Guerrero *et al.*, 2014). Por lo tanto, en la masa de maíz nixtamalizado se encuentra una mezcla de gránulos de almidón no gelatinizados, y parcialmente gelatinizados, lo que explica el descenso en el grado de cristalinidad.

El grado de cristalinidad del gránulo de almidón, en la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico (Cuadro 7), disminuye 53 % en el séptimo día, y 82 % en el día veinticinco de la fermentación, con respecto al valor inicial. Esto indica que la naturaleza semi-cristalina, del gránulo de almidón se ve afectada.

Cuadro 7. Grado de cristalinidad del gránulo de almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

Tratamiento	Día	Área cristalina (picos)	Área total*	Cristalinidad (%)
Sin tratamiento térmico	0	2501	3.18×10^4	7.87
	7	1237	3.38×10^4	3.66
	25	466.6	3.24×10^4	1.44
Con tratamiento térmico	0	1171	3.66×10^4	3.20
	7	1202	2.94×10^4	4.06
	25	1180	3.89×10^4	3.03

*amorfa + cristalina

En el caso de la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente, el grado de cristalinidad del gránulo de almidón (Cuadro 7), aumenta 21 % en el séptimo día, y disminuye 5 % en el día veinticinco, con respecto al valor inicial. El aumento del séptimo día se debe a la retrogradación del almidón, durante el almacenamiento y reposo, después del tratamiento térmico aplicado. La retrogradación implica, la reorganización de los componentes macromoleculares del almidón, después de la desorganización del orden

nativo de los gránulos de almidón (Matignon & Tecante, 2017), que en este caso se presenta como un aumento en el grado de cristalinidad. Mientras que la disminución en el día veinticinco, se debe a que la naturaleza semi-cristalina del almidón es afectada.

3.6 Tamaño de partícula y distribución de tamaños

La distribución volumétrica, durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, predomina en el intervalo de valores de tamaño de 10 a 100 micrómetros durante los primeros siete días de la fermentación (Figura 19).

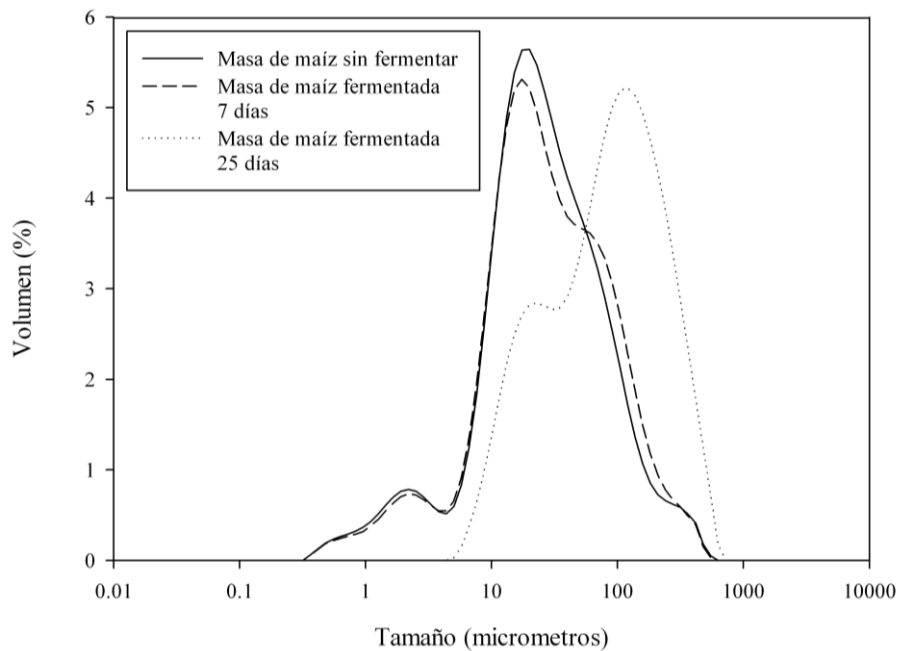


Figura 19. Distribución volumétrica del tamaño de partícula en masa de maíz nixtamalizado sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

El intervalo es amplio, debido a que, en la masa de maíz nixtamalizado, hay presencia de estructuras como los gránulos de almidón de maíz, que predominan en el intervalo de 5-25 micras, y los valores superiores, corresponden a estructuras vegetales del grano de maíz que son de mayor

tamaño, es decir, otros sólidos insolubles. A los veinticinco días de la fermentación, el intervalo de la distribución volumétrica se desplaza a valores más grandes, predominando de 100 a 800 micrómetros. Este desplazamiento sugiere algún tipo de modificación de los gránulos de almidón, por ejemplo, erosión, durante la fermentación que hace que los gránulos de almidón ya no predominen, y en consecuencia su tamaño se vea afectado.

En el caso de la masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico (Figura 20), la distribución volumétrica predomina en el intervalo de 100 a 1000 micrómetros en la masa al inicio, y de 60 a 800 micrómetros en los días siete y veinticinco del proceso.

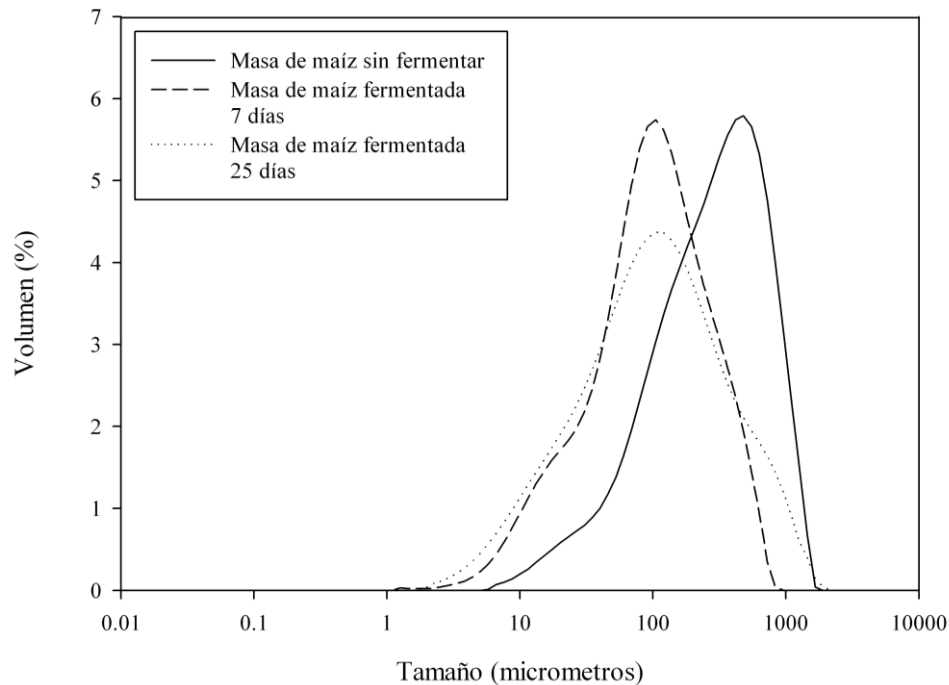


Figura 20. Distribución volumétrica del tamaño de partícula en masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente sin fermentar y fermentada durante 7 y 25 días.

Los intervalos de valores del tamaño son superiores en la masa de maíz nixtamalizado tratada térmicamente, que en la que no recibió tratamiento térmico, indicando que se generan estructuras de mayor tamaño debido a la

disrupción y salida de la amilosa y amilopectina de los gránulos de almidón, y posiblemente a la agregación de proteínas que podrían ser desnaturalizadas durante el tratamiento térmico. La disminución en el intervalo de tamaño, en los días siete y veinticinco, indica que hay degradación de las estructuras durante el proceso.

La técnica de difracción láser proporciona el diámetro mediano $D(v, 0.5)$ (Cuadro 8), que representa el tamaño en el que 50 % de las partículas en volumen son más pequeñas, y 50 % son más grandes. Para la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico, el valor de $D(v, 0.5)$ tiende a aumentar durante la fermentación.

Por otro lado, para la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico, se observa que el valor de $D(v, 0.5)$ tiende a disminuir durante la fermentación.

Cuadro 8. Diámetro mediano durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con diferente tratamiento.

Día	$D(v, 0.5) \mu\text{m}$	
	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
0	30.2 ± 3.48	310 ± 17.9
7	31.5 ± 3.35	106 ± 1.83
25	93.4 ± 1.23	111 ± 5.86

CONCLUSIONES

Los parámetros térmicos del almidón no cambian durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado con y sin tratamiento térmico. Por lo tanto, la estabilidad térmica no es afectada por la actividad microbiana.

La extensión de la fermentación por veinticinco días, si resultó en afectaciones de la morfología, la capacidad de birrefringencia y la superficie de los gránulos de almidón.

El tamaño del gránulo de almidón durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico se mantiene dentro del intervalo típico de 5-25 μm para los gránulos nativos de almidón de maíz.

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido muestran el efecto del tratamiento térmico, sobre los gránulos de almidón presentes en la masa de maíz nixtamalizado. Durante la fermentación se observan cambios en la morfología de los gránulos gelatinizados.

La cristalinidad del gránulo de almidón durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico disminuyó 53 % al séptimo día y 82 % al vigésimo quinto día con respecto al valor inicial. Por otro lado, durante la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico, se observó un aumento de 21 % al séptimo día y una disminución de 5 % al vigésimo quinto día con respecto al valor inicial.

La distribución volumétrica del tamaño de partícula muestra que los valores típicos de tamaño del gránulo de almidón no predominan al final de la fermentación de masa de maíz nixtamalizado sin tratamiento térmico.

Por otro lado, durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado con tratamiento térmico, la distribución volumétrica se desplaza hacia menores tamaños, lo que se interpreta como producto de la degradación de la morfología de los gránulos de almidón gelatinizados.

REFERENCIAS

- Apinan, S., Forssell, P., Hidefumi, Y., Myllärinen, P., Poutanen, K., Takeshi, F. & Yujiro, F. (2007). Visual observation of hydrolyzed potato starch granules by α -amylase with confocal laser scanning microscopy. *Starch/Stärke* 59, 543-548.
- Babić, J., Subaric, D., Milicevic, B., Ackar, D., Kopjar, M. & Tiban, N. (2009). Influence of trehalose, glucose, fructose, and sucrose on gelatinisation and retrogradation of corn and tapioca starches. *Czech Journal of Food Science* 27(3), 151-157.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. Cuarta edición. Pearson, México, pp. 81-88 y 91.
- Belitz, H., Grosch, W. & Schieberle P. (2009). *Food Chemistry*. Cuarta edición revisada y extendida. Springer, Berlin, pp. 317, 333 y 334.
- Castillo, M., Wachter, C. & Hernández, H. (2005). Preliminary studies on chorote—a traditional Mexican fermented product. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 293-296.
- Chauhary, D., Kumar, S. & Langyan, S. (2014). *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Srpinge, Nueva Delhi: p. 73.
- Coral, D., Pineda, P., Rosales, A. & Rodríguez, M. (2009). Determination of the gelatinization temperature of starch presented in maize flours. *Journal of Physics* 167, 1-5.
- Cui, S. (2005). *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 315-318, 322 y 323.
- Cuniff, P. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Décimo sexta edición. Volumen II. Virginia. USA.
- Dhital, S., Warren, F., Butterworth, P., Ellis, P. & Gidley, M. (2015). Mechanisms of starch digestion by α -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(5), 875-892.

- Díaz, G., Guyot, J., Ruiz, F., Morlon, F. & Wachter, 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. *Applied Environmental Microbiology* 69(8), 4367-4374.
- Eliasson, A. (2017). *Carbohydrates in Food*. Tercera edición. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 378, 480, 492, 493, 506, 527 y 528.
- Gous, P. & Fox, G. (2017). Review: Amylopectin synthesis and hydrolysis—understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality. *Trends in Food Science & Technology* 62, 23-32.
- Guerrero, I. García, B., Wachter, M. & Regalado, C. (2014). *Microbiología de los Alimentos*. Limusa, Ciudad de México, pp. 263, 373, 390, 391 y 394.
- Hizukuri, S., Abe, J. & Hanashiro I. (2006). Starch: Analytical Aspects. En: Eliasson, A. ed. *Carbohydrates in Food*. Taylor & Francis Group, Boca Raton. Capítulo 9.
- Homer, S., Kelly, M. & Day, L. (2014). Determination of thermo-mechanical properties in starch and starch/gluten systems at low moisture content – A comparison of DSC and TMA. *Carbohydrate Polymers* 108, 1-9.
- Iturbe, F. & Sandoval, J. (2013). *Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas*. Facultad de Química UNAM, Ciudad de México. pp. 18 y 67.
- Lees, R. (1982). *Análisis de los Alimentos Métodos Analíticos y de Control de Calidad*. Segunda edición. Acribia. Zaragoza. pp. 176 y 177.
- Li, Q., Li, H. & Gao, Q. (2015). The influence of different sugars on corn starch gelatinization process with digital image analysis method. *Food Hydrocolloids* 43, 803-811.
- López, M., Rodríguez, M., López, A. & Wachter, C. (2017). Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. *LWT-Food Science and Technology* 89, 192-197.

- Mabood, I., Kumar, S. & Tran, T. (2011). Effect of physico-chemical properties of tropical starches and hydrocolloids on rice gels texture and noddles water retention ability. *Starch/Stärke* 63, 558-569.
- Matignon, A & Tecante, A. (2017). Starch retrogradation: From starch components to cereal products. *Food Hydrocolloids* 68, 43-52.
- Monet, D. & Ray, R. (2016). *Fermented Foods Part I: Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, pp. 113, 114, 134-136.
- Nielsen, S. (2017). *Food Analysis*. 5th edition. Springer. West Lafayette. pp. 262-264, 345, 346 y 396.
- Nielsen, S. (2017). *Food Analysis Laboratory Manual*. 3rd edition. Springer. West Lafayette. pp. 107 y 108.
- Perry, P. & Donald, A. (2001). The effect of sugars on the gelatinisation of starch. *Carbohydrate Polymers* 49, 155-165.
- Petrova, P., Petrov, K. & Stojancheva, G. (2013). Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria- structures, properties and applications. *Starch/Stärke* 65, 34-47.
- Pineda, P., Coral, D., Arciniegas, M., Rorales, A. & Rodríguez, M. (2010). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. *Ingeniería y Ciencia* 6(11), 129-141.
- Ratnajake, W., Otani, C. & Jackson D. (2009). DSC enthalpic transitions during starch gelatinization in excess water, dilute sodium chloride and dilute sucrose solutions. *Journal of Science Food Agriculture* 89, 2156-2164.
- Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B., Venkateshwar, M. & Vijay, E. (2007). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. *Biotechnology Advances* 26, 22-34.
- Reyes, I., Cruz, F., Hernández, C., Vernon, E. & Álvarez, J. (2017). Effects of solid-state fermentation (*Aspergillus oryzae* var. *Oryzae*) on the physicochemical properties of corn starch. *Starch/Stärke* 69, 1-10.

- Santiago, D., Figueroa, J., Véles, J. & Mariscal, R. (2017). Changes in thermal and structural properties of maize during nixtamalization and tortilla-making processes as affected by grain hardness. *Journal of Cereal Science* 74, 72-78.
- Schirmer, M., Jekle, M. & Becker, T. (2015). Starch gelatinization and its complexity for analysis. *Starch/Stärke* 67, 30-41.
- Taniguchi, H. & Honnda, Y. (2009). Amylases. En: Schaechter, M. ed. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press. Oxford. pp. 159-173.
- Uthumporn, U., Zaidul, I. & Karim, A. (2010). Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food and Bioproducts Processing* 88, 47-54.
- Wacher, C. (2014). La Biotecnología Alimentaria Antigua: Los Alimentos Fermentados. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 15(8), 2-14.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q. & Wang, S. (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 568-585.
- Wong, D. (2018). *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. 2nd edition. Springer. Albany. pp. 143-147.
- Yang, Q., Hui, X., Qiang, Y. & Huang, L. (2017). Improvement in corn flour applicability using lactic acid fermentation: A mechanistic study. *Starch/Stärke* 69, 1-9.
- Yuan, M., Lu, Z., Cheng, Y. & Li, L. (2008). Effect of spontaneous fermentation on the physical chemistry of corn starch and rheological characteristics of corn starch noodles. *Journal of Food Engineering* 85, 12-17.