



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y TÉRMICO MEDIANTE
MICROCALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO DE LA
FERMENTACIÓN DE MASA DE NIXTAMAL PARA POZOL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA DE LOURDES MÉNDEZ RAMÍREZ

ASESOR

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE



Ciudad Universitaria, CD. MX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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: María del Carmen Wacher Rodarte**

VOCAL: **Profesor: Gloria Díaz Ruiz**

SECRETARIO: **Profesor: Francisco Ruiz Terán**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Aleida Mina Cetina**

2° SUPLENTE: **Profesor: Roeb García Arrazola**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

**Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E,
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.**

ASESOR DEL TEMA

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte

SUPERVISOR TÉCNICO

I. A. Mariana Ramírez Gilly

SUSTENTANTE

María de Lourdes Méndez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN223917 “Combinando la microbiología y la bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 FERMENTACIÓN	3
2.1.1 Bacterias ácido lácticas	4
2.1.2 Bacterias ácido lácticas amilolíticas	6
2.1.3 Fermentación en estado sólido	7
2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES	10
2.3 POZOL	11
2.3.1 Elaboración del pozol	12
2.3.2 Microbiota del pozol	14
2.4 NIXTAMALIZACIÓN	15
2.5 MAÍZ	18
2.5.1 Estructura del grano de maíz	19
2.6 ALMIDÓN	21
2.6.1 Amilosa	21
2.6.2 Amilopectina	21
2.6.3 Gránulos de almidón	22
2.7 GELATINIZACIÓN	22
2.8 RETROGRADACIÓN	23
2.9 MICROCALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (μ DSC)	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 MUESTRA DE ESTUDIO	28
5.2 METODOLOGÍA GENERAL	28

5.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	30
5.3.1 Determinación de humedad	30
5.3.2 Determinación de pH	30
5.3.3 Determinación de acidez	30
5.4 ANÁLISIS QUÍMICO	30
5.4.1 Concentración de carbohidratos solubles totales	30
5.4.2 Concentración de carbohidratos reductores	30
5.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	31
5.5.1 Cuentas viables	31
5.5.2 Descripción colonial y microscópica	31
5.6 ANÁLISIS TÉRMICO EMPLEANDO μ DSC	32
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 PRIMERA FERMENTACIÓN NATURAL DE MASA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO	33
6.1.1 Microbiota natural	33
6.1.2 Cambios en las características de masa de nixtamal	41
6.1.3 Cambios en la concentración de CST y CR por efecto de la fermentación	44
6.2 SEGUNDA FERMENTACIÓN NATURAL DE MASA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO	47
6.2.1 Microbiota natural	47
6.2.2 Cambios en las características de masa de nixtamal	49
6.3 TRANSICIONES OBSERVADAS EN MASAS DE NIXTAMAL FERMENTADAS	52
7. CONCLUSIONES	56
8. PERSPECTIVAS	57
9. REFERENCIAS	58
10. ANEXOS	69

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
ATP	Adenosin trifosfato
BAAL	Bacterias ácido lácticas amilolíticas
BAL	Bacterias ácido lácticas
°C	Grado Celsius
cm	Centímetro
CR	Carbohidratos reductores
CST	Carbohidratos solubles totales
ΔH	Entalpía
ΔT	Diferencia de temperatura
dt	Diferencia de tiempo
FES	Fermentación en estado sólido
g	Gramo
G (-)	Gram negativo
G (+)	Gram positivo
h	Hora
J	Joule
m	Metro
M	Molar, mol/L
MC	Maíz ceroso de maíz
mcal	Milicaloría
μ DSC	Microcalorimetría diferencial de barrido
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
N	Normal, equivalente-gramo de soluto/L
nm	Nanómetro

s	Segundo
Tf	Temperatura final
Tg	Temperatura de transición vítrea
Ti	Temperatura inicial
Tp	Temperatura pico
ufc	Unidades formadoras de colonia
v.e.	Valor estimado

RESUMEN

La demanda de productos alimenticios fermentados promovedores de la salud se ha incrementado (Ray & Montet, 2015). De esta manera, toma relevancia el estudio de nuestros alimentos fermentados tradicionales mexicanos como el pozol, bebida ácida, refrescante, no alcohólica que se elabora a partir de masa de nixtamal fermentada y se consume durante la comida, el trabajo o a cualquier hora del día. Este proyecto se realizó con el objetivo de conocer los cambios en las transiciones térmicas de masa de nixtamal causados por su fermentación natural mediante un análisis térmico con microcalorimetría diferencial de barrido y estudiar los cambios en los principales grupos microbianos presentes naturalmente en la masa de nixtamal durante el proceso fermentativo. Para ello, se realizó la cuenta viable de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido lácticas amilolíticas (BAAL), microorganismos xilanolíticos, microorganismos mesófilos aerobios no lácticos, levaduras y mohos durante la fermentación a 30 °C de masa de maíz nixtamalizado proveniente de Villahermosa, Tabasco. Durante la fermentación se observaron comportamientos distintos entre los grupos microbianos estudiados, predominando las BAL. Para observar el efecto del crecimiento de la microbiota sobre las características de la masa, se realizaron mediciones de pH, acidez, concentración de carbohidratos solubles totales y carbohidratos reductores. El pH inicial disminuyó de 7.0 ± 0.6 a 3.5 ± 0.1 al sexto día de fermentación, la acidez de valores iniciales de $0.06 \pm 0.02\%$ aumentó a $1.67 \pm 0.25\%$ y la humedad de $52.2 \pm 0.5\%$ aumentó a $55.5 \pm 1.8\%$. Las cuentas microbianas, los carbohidratos solubles totales y los carbohidratos reductores se comportaron de manera semejante que en otras fermentaciones de pozol. A partir del análisis térmico de las masas de nixtamal fermentadas a diferentes tiempos de fermentación fue posible observar transiciones endotérmicas que se propone corresponden a la gelatinización de almidón, cuyas características no sufrieron cambios significativos.

1. INTRODUCCIÓN

Una dieta a base de cereales proporciona calorías suficientes para el cuerpo humano pero no cantidades suficientes de micronutrientes (Lichtfouse & Goyal, 2015). Sin embargo, tanto la digestibilidad como el contenido de nutrientes esenciales de un alimento en particular pueden ser mejorados a través de la fermentación (Karovičová & Kohajdová, 2003).

Los materiales disponibles localmente y los métodos de preparación están relacionados con la cultura y la tradición. La preparación de alimentos fermentados todavía permanece como un arte casero en muchas regiones que están aisladas, y se transmiten normalmente de generación en generación (Ray & Montet, 2015).

Los productos que contienen probióticos son muy conocidos, sobre todo los elaborados a partir de productos lácteos; sin embargo, los elaborados a partir de cereales están tomando relevancia. La elección de cereales como sustratos para el desarrollo de alimentos probióticos se ve motivada por el aumento del vegetarianismo, la intolerancia a la lactosa, el contenido de colesterol y por razones económicas asociadas con los productos lácteos.

Los cereales son cultivos muy importantes que se usan como alimentos en muchas partes del mundo, así como excelentes sustratos para la fermentación en la que los microorganismos predominantes son las bacterias ácido lácticas y las levaduras (Ogunremi *et al.*, 2015). La microbiología de la mayoría de estos productos fermentados a base de cereales es bastante compleja y no se conoce con detalle.

El tipo de microbiota desarrollada en cada alimento fermentado depende de la actividad de agua, el pH, la concentración de sal, la temperatura y la composición de la matriz alimenticia (Blandino *et al.*, 2003). Por lo general son fermentaciones naturales (que no se inoculan con microorganismos) y se usan técnicas tradicionales que han sido desarrolladas para mantener cultivos iniciadores vivos para estos procesos. Pero con el creciente impacto de la microbiología industrial durante el siglo XX, esta propagación tradicional de cultivos iniciadores ha sido remplazada, especialmente en la industria de lácteos, por el uso de cultivos puros, congelados o liofilizados cultivados en medios de cultivo. Antes de inocularlos se pasteuriza el sustrato para eliminar la mayoría de la microbiota nativa, sin embargo,

esto causaría la gelatinización del almidón y la inactivación de enzimas endógenas. En ese caso, los cultivos iniciadores pueden competir con la carga microbiana de las materias primas y adaptarse a los sustratos. La ecología microbiana específica depende del tipo de cereal y de las condiciones del proceso (Brandt, 2014).

Como con cualquier otro proceso de fermentación, la comprensión de la ecología microbiana de las fermentaciones de cereales, requiere del conocimiento de los sustratos de la fermentación, es decir, los granos o semillas de diversas plantas de cereales. En la fermentación de éstos, enzimas endógenas, bacterias, levaduras y hongos juegan un papel ya sea individual o en conjunto y contribuyen en la creación de una gran variedad de productos (Hammes *et al.*, 2005).

Es común que en las fermentaciones lácticas de productos a base de cereales se adicionen amilasas antes o durante la fermentación, o que se inoculen con bacterias amilolíticas para realizar la sacarificación del almidón de los granos (Koravičová & Kohajdová, 2007).

Estos procesos fermentativos provocan cambios en la textura, el sabor, la apariencia y las propiedades nutrimentales de los alimentos y si se desarrollan adecuadamente las bacterias lácticas, que producen sustancias antimicrobianas, pueden eliminarse microorganismos patógenos y lograrse la seguridad microbiológica de los alimentos sometidos a este proceso. Los beneficios de la fermentación incluyen el mejoramiento de la palatabilidad y su aceptabilidad, ya que mejoran su sabor y textura; su conservación, puesto que producen ácidos, alcohol y compuestos antimicrobianos; enriquecen la calidad nutrimental, pues producen nutrientes esenciales y aumentan la digestibilidad de las proteínas y de los carbohidratos; remueven antinutrientes, tóxicos naturales y micotoxinas; reducen el tiempo de cocción (Haard *et al.*, 1999).

2. ANTECEDENTES

2.1 FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso bioquímico que forma parte del catabolismo anaeróbico de compuestos orgánicos, generalmente carbohidratos. Es un proceso de oxidorreducción (redox) equilibrado internamente, en el que el sustrato fermentable se oxida y se reduce a la vez y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan *et al.*, 2009).

La fermentación es una tecnología, de las más antiguas, utilizada para la conservación de alimentos y uno de los procesos económicos más importantes de producción de alimentos para consumo humano (Kalui *et al.*, 2010; Nyanzi & Jooste, 2012). A través del tiempo ésta ha tenido un impacto importante en los hábitos nutricionales, las tradiciones, la cultura, la distribución comercial y en el almacenamiento de alimentos. Los procesos tradicionales de fermentación, sirven como sustituto de la refrigeración donde no es accesible o de otras formas de conservación (Holzapfel, 2002).

La fermentación tiene por lo menos cinco funciones en el procesamiento de alimentos: enriquecimiento de la dieta humana a través del desarrollo de una amplia variedad de sabores, aromas y texturas en los alimentos; conservación de alimentos por medio de las fermentaciones ácido láctica, alcohólica, acética y alcalina; enriquecimiento biológico con sustratos alimenticios tales como proteína, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas; desintoxicación durante la fermentación de alimentos; disminución del tiempo de cocción y de requerimientos energéticos (Károvičová & Kohajdová, 2007).

Durante estas fermentaciones se activan las enzimas presentes, el pH disminuye esto selecciona el funcionamiento de ciertas enzimas, por ejemplo, amilasas, proteasas, hemicelulasas y fitasas.

En general, la fermentación es un proceso que se desarrolla bajo la influencia de actividades ejercidas por enzimas y/o microorganismos (Poutanen *et al.*, 2009).

La variación de los parámetros ecológicos, tales como la naturaleza del cereal, la temperatura, el tamaño del inóculo y duración de los intervalos de propagación conducen en cada caso a una asociación de especies característica.

Los procesos de fermentación de cereales se ven afectados por ciertas variables, cuyo control es la base de todas las medidas tecnológicas usadas para obtener los distintos productos con una calidad definida. Estas variables incluyen el tipo de cereal, que determina los sustratos fermentables, los nutrientes, los factores de crecimiento, los minerales y la capacidad reguladora. También la eficacia de las sustancias inhibitoras del crecimiento, el contenido de agua, el grado y la trituración de los granos antes o después del remojo, la duración y tiempo de fermentación, los compuestos adicionados al sustrato fermentable, como sales, azúcares, lúpulo y oxígeno. La actividad amilolítica que es necesaria para la obtención de azúcares fermentables a partir del almidón y de otros polisacáridos. De estas variables, el tipo de cereal juega un papel clave, ya que interviene en la cantidad y la calidad de los carbohidratos como sustratos primarios de fermentación, la fuente de nitrógeno y los factores de crecimiento como vitaminas y minerales (Hammes *et al.*, 2005).

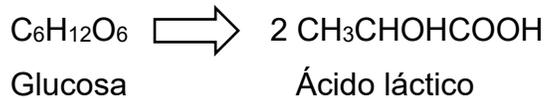
2.1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Son un grupo de microorganismos que fermentan azúcares para producir ácido láctico como producto predominante, en la Figura 1 se presenta un diagrama del metabolismo de las BAL.

Son bacterias Gram positivas, presentan forma celular de cocos o de bacilos, tienen un contenido bajo de guanina-citosina. Muchas de las BAL crecen en condiciones anaeróbicas pero pueden ser aerotolerantes (crecer en presencia de oxígeno), ya que se pueden proteger de los subproductos del oxígeno (por ejemplo H_2O_2) porque cuentan con peroxidasas. Este grupo de bacterias se divide en dos subgrupos en base a patrones de fermentación (Reddy *et al.*, 2008; Ray & Montet, 2015).

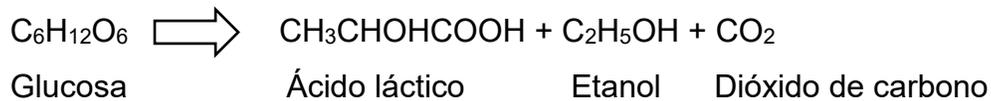
a) Homofermentativas

Este subgrupo de bacterias produce más de 85% de ácido láctico a partir de glucosa por la vía glucolítica (Embden-Meyethof). *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* pertenecen a este grupo. La fermentación de un mol de glucosa produce dos moles de ácido láctico, generando un rendimiento neto de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa.



b) Heterofermentativas

Este subgrupo de bacterias produce sólo 50% de ácido láctico y concentraciones considerables de etanol, acetato y CO₂ por la vía hexosa monofosfato. Se genera un mol de ATP por molécula de glucosa. Bacterias involucradas en este subgrupo pertenecen a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. La vía bioquímica se describe a continuación:



Las bacterias ácido lácticas son los principales microorganismos utilizados para fermentar alimentos a base de maíz, sorgo o mijo en el oeste de África. El uso de BAL como cultivos iniciadores durante la fermentación de masa de cereales es un tema de creciente interés en la tentativa por estandarizar esta etapa y garantizar productos uniformes (Soro-Yao *et al.*, 2014).

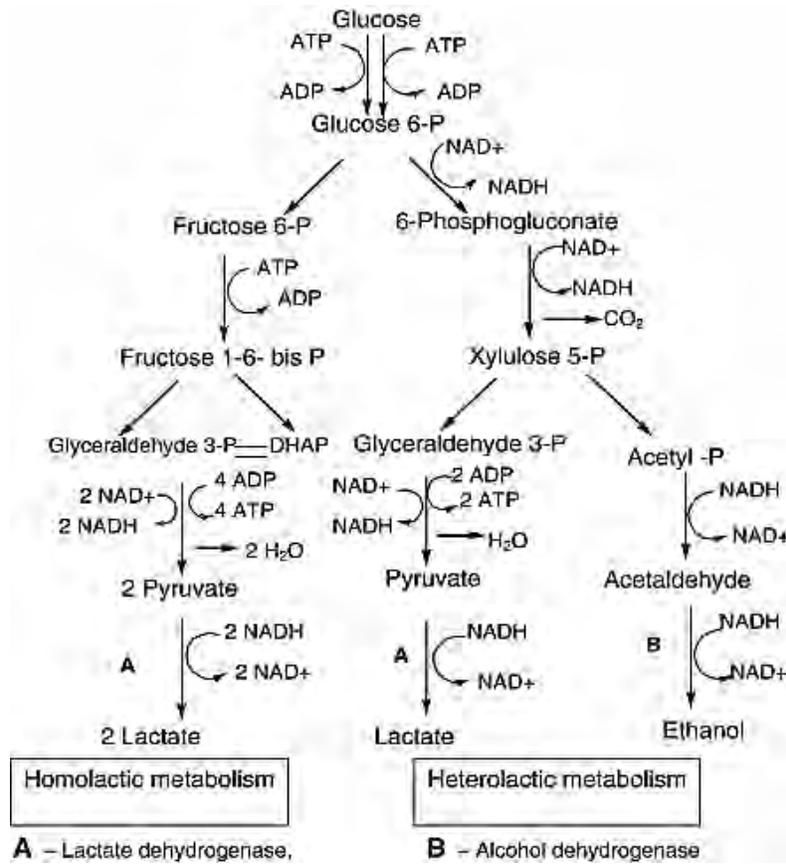


Figura 1. Metabolismo de bacterias ácido lácticas (Reddy *et al.*, 2008).

2.1.2 Bacterias ácido lácticas amilolíticas (BAAL)

Las bacterias ácido lácticas amilolíticas, en repetidas ocasiones, han sido aisladas de alimentos tradicionales fermentados a base de cereales (Johansson *et al.*, 1995; Olympia *et al.*, 1995; Sanni *et al.*, 2002).

La búsqueda de BAAL en alimentos amiláceos fermentados se ha justificado por el alto contenido de almidón en las materias primas. Su papel aún no ha sido elucidado, ya que mono y disacáridos como glucosa y sacarosa están presentes naturalmente en la mandioca y cereales, disponibles para la fermentación ácido láctica (Ray & Montet, 2016). Es necesaria la investigación de su fisiología, el estudio de la ecología de la fermentación natural de cultivos amiláceos para desarrollar nuevos procesos y mejorar las técnicas existentes sobre una base más racional mediante el uso de cultivos iniciadores específicos (Guyot *et al.*, 2000).

Representantes importantes de este grupo pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Petrova *et al.*, 2013). Las BAAL producen enzimas que modifican el almidón (amilasas), las cuales tienen un amplio espectro de aplicaciones (Bhanwar & Ganguli, 2014; Smerilli *et al.*, 2015).

Las enzimas amilolíticas (α -glucanasas) hidrolizan los enlaces glucosídicos en varios glucanos. Estas enzimas pertenecen a tres familias α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas. Con base en su modo de acción se dividen en dos categorías endoamilasas (α -amilasas, pululanastas e isoamilasas) y exoamilasas (β -amilasas y glucoamilasas). Dentro de la amplia variedad de enzimas amilolíticas sintetizadas por microorganismos, las α -amilasas son los biocatalizadores más ampliamente utilizados. Estas son enzimas extracelulares que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4-glucosídicos en el almidón, liberando oligosacáridos lineales y ramificados de diferentes longitudes de cadena, así como glucosa (Sharma & Satyanarayana, 2013).

Las bacterias ácido lácticas amilolíticas son utilizadas principalmente en la industria de procesamiento de almidón para la producción de ácido láctico. Su capacidad de convertir el almidón directamente en ácido láctico unificando la etapa de sacarificación y fermentación en un proceso, las hace económicamente más atractivas. Dependiendo de la bioseguridad y composición de las cepas, se pueden aplicar en el desarrollo de alimentos fermentados, bebidas y alimentos para niños (Reddy *et al.*, 2008; Ray & Montet, 2016).

2.1.3 Fermentación en estado sólido (FES)

La mayoría de los productos fermentados en la antigüedad provenían de una fermentación sólida. La fermentación en estado sólido puede ser definida como una técnica de cultivo de microorganismos sobre y dentro de partículas humedecidas de un sustrato sólido. El contenido líquido unido a la matriz sólida asegura un correcto crecimiento y metabolismo de las células, sin exceder la capacidad máxima de retención de agua de la matriz sólida.

La matriz sólida puede ser la fuente de nutrientes o simplemente un soporte impregnado de los nutrientes apropiados que permitan el desarrollo de los microorganismos. El potencial de la fermentación en estado sólido yace en provocar una cercanía entre los microorganismos cultivados y los sustratos consiguiendo una mayor concentración de sustratos para la fermentación (Singhania *et al.*, 2009).

Este tipo de fermentación no es uniforme, especialmente en lo que se refiere al crecimiento microbiano, debido a variaciones en la absorción de nutrientes y en secreción de metabolitos. Sin embargo, presenta ventajas sobre la fermentación en estado líquido, ya que requiere poca energía, produce menor cantidad de aguas residuales, por lo que es un proceso amigable con el medio ambiente.

El crecimiento de microorganismos, especialmente hongos filamentosos y levaduras durante la fermentación sólida se asemeja más al hábitat natural de los microorganismos en comparación con la fermentación líquida, durante la cual se producen algunas enzimas y metabolitos. Por ello, esta técnica de fermentación se ha utilizado ampliamente durante las últimas décadas. Tiene potencial económico para la elaboración de productos en la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola y de piensos (Chen & Zhu, 2014).

Consideraciones generales

-La selección del sustrato depende de parámetros físicos como el tamaño de partícula, el costo, el espaciado intrapartícula y la composición de nutrientes. Generalmente sustratos con partículas más pequeñas proporcionan un área superficial mayor disponible para los microorganismos, sin embargo un tamaño de partícula demasiado pequeño puede interferir en la aireación y la respiración microbiana resultando en un crecimiento menor. Por otro lado, partículas de mayor tamaño proporcionan mejor eficiencia de respiración y aireación (debido al aumento del espacio entre partículas) pero la superficie proporcionada para que los microorganismos puedan adherirse es limitada (Pandey *et al.*, 2000).

-El contenido de humedad es un factor clave que determina la estabilidad del proceso y el rendimiento durante la fermentación. Puede afectar el estado físico de los sustratos, la difusión y la utilización de los nutrientes, el intercambio entre el

oxígeno y dióxido de carbono y la transferencia de masa y calor. Un contenido alto de humedad usualmente conduce a una aglomeración de partículas, transferencia de gas limitada, mala aireación y contaminación bacteriana. Un contenido bajo de humedad reduce la difusión de nutrientes, el crecimiento celular, la estabilidad enzimática y el rendimiento. De este modo, un nivel de humedad óptimo se puede determinar de acuerdo con las propiedades de las materias primas, tipo de microorganismos y condiciones del cultivo.

-pH: cada microorganismo posee un intervalo de pH específico para su actividad y crecimiento. El pH de los sustratos usualmente cambia en respuesta a las actividades metabólicas. Los ácidos orgánicos producidos por las cepas normalmente disminuyen el pH. Sin embargo, la asimilación de ácidos orgánicos en algunos medios puede conducir a un aumento de pH (Krishna, 2005). El control de pH usualmente se integra con el control de humedad en el sistema FES que utiliza enfriamiento por vapor para remover calor. Las sustancias ácidas o básicas se disuelven en agua a la concentración deseada y después se rocían sobre la superficie del medio.

-Transferencia de oxígeno: el crecimiento microbiano resulta en la formación de una película de biomasa en la superficie sólida y los sustratos metabolizados se aglomeran volviéndose viscosos. Por otro lado, una humedad alta y sustratos viscosos afectan la transferencia de oxígeno en el medio. En aplicaciones a gran escala, la agitación y aeración son utilizadas para evitar la deficiencia de oxígeno en el medio y promover el crecimiento microbiano.

La aireación cumple cuatro funciones principales en la fermentación en estado sólido: 1) mantener condiciones aeróbicas, 2) desorción de dióxido de carbono, 3) regular la temperatura del sustrato y 4) regular el nivel de humedad (Raimbault, 1998).

2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

Se estima que 25% de la dieta europea y 60% de la dieta de muchos países en vías de desarrollo está compuesta por alimentos fermentados (Adebayo *et al.*, 2013).

Sin embargo, es sólo durante las últimas décadas que se ha puesto en evidencia que la gran mayoría de los alimentos fermentados cuentan con una serie de propiedades fundamentales para una dieta variada y equilibrada, esta es quizá una de las razones por las cuales su preparación y consumo se ha mantenido hasta nuestros días. En casi todos los casos, estos productos están fuertemente arraigados a la cultura de las regiones en las que fueron desarrollados o adaptados; en otros casos los alimentos se han beneficiado de los avances científicos y tecnológicos, como la cerveza, el vino o la producción de yogurt; en otros, el proceso se mantiene con muy poca innovación, tal es el caso del pozol o del pulque en México (Wacher, 2014).

A los alimentos fermentados se les define como aquellos productos que han sido sometidos al efecto de microorganismos o enzimas que causan cambios bioquímicos deseables y son producidos en todo el mundo utilizando diferentes técnicas de fabricación, materias primas y microorganismos (Blandino *et al.*, 2003). Con cada alimento fermentado se asocia una microbiota única (Kumar *et al.*, 2012). Los alimentos fermentados como el pan, el queso, la cerveza y el vino han sido preparados y consumidos durante miles de años. Estudios arqueológicos han demostrado el uso del proceso de fermentación por culturas antiguas para la elaboración de productos alimenticios (Delwen, 1996a; Delwen, 1996b; McGovern *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2010). En América Latina existen regiones en las cuales los productos fermentados se siguen elaborando tradicionalmente usando equipos muy sencillos. En mercados especializados de todo el mundo, estos productos fermentados son altamente apreciados y se consideran de calidad por sus características de sabor y por ser únicos.

En la Tabla 1 se presentan ejemplos de alimentos y bebidas fermentados a base de cereales. Los alimentos fermentados indígenas cuentan con cualidades organolépticas especiales y algunos incluso poseen propiedades promotoras de la salud. Esto se debe principalmente a la diversidad biológica de la microbiota

presente en las materias primas como contaminación debida a los productores o instrumentos usados para prepararlos. Estos microorganismos son depósitos genéticos importantes y contienen un gran potencial biotecnológico y de mejora a la salud que podría ser explotado. Muchos microorganismos han evolucionado en condiciones ambientales severas para sobrevivir, mientras que otros lo han hecho para producir enzimas y compuestos necesarios para su crecimiento en materias primas alimenticias. Es esencial aislar y conservar la microbiota nativa que se encuentra en estos productos, ya que constituyen especies microbianas importantes desde el punto de vista tecnológico y su fisiología es generalmente novedosa (Ray & Montet, 2015).

2.3 POZOL

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México se encuentra el pozol, bebida de maíz de origen maya que forma parte de la alimentación básica de grupos étnicos del sur y el sureste de México, en particular de Chiapas (lacandones, chamulas o tzotziles, tzeltales, choles mames y zoques), Tabasco (chontales y choles), Campeche, Yucatán y Quintana Roo (mayas) y Oaxaca (zapotecos) junto con la población mestiza. El nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso (Herrera, 2003; Wachter, 2014).

Además de su uso como alimento, esta bebida ha sido empleada con fines medicinales y ceremoniales. En el pasado, las bolas de pozol eran utilizadas por los mayas como cataplasmas para prevenir o curar las infecciones superficiales y las heridas. Actualmente los lacandones utilizan el pozol mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea y otros padecimientos intestinales.

El pozol también ha tenido una gran importancia ceremonial, pues ya desde tiempos prehispánicos se usaba como ofrenda en las diversas festividades mayas relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz.

Este alimento es preparado ya sea en forma doméstica para el consumo de la misma familia que lo hace, o en escala semicomercial para ser vendido en el mercado (Ulloa *et al.*, 1987).

2.3.1 Elaboración del pozol

En el método tradicional de su preparación, los granos de maíz (ya sea blanco, amarillo o negro) son hervidos en agua con cal, hinchándose y el pericarpio se separa fácilmente. Se lavan con agua, se escurren y se hace una molienda húmeda para formar una masa gruesa. Con la masa se forman bolas que se envuelven en hojas de plátano u otras y se dejan fermentar por tiempos que varían considerablemente, ya que en algunos casos sólo se fermentan por unas horas, mientras que en otros se dejan madurar que consiste en dejar las bolas de pozol envueltas en hojas de plátano a temperatura ambiente, generalmente tiene una duración de 4 días pero algunas personas lo fermentan 3, 8, 9 días o hasta un mes, cuando ya presenta un notorio crecimiento superficial de mohos. Las bolas de maíz fermentadas se consumen disueltas en agua durante la comida, el trabajo o a cualquier hora del día como una bebida refrescante (Nuraida *et al.*, 1995; Wachter, 2014). Incluso, los indígenas de Chiapas o de otros estados del Sureste lo llevan como provisión antes de emprender un viaje o antes de iniciar su jornada de trabajo (Romo, 1988).

Existen variaciones en las preferencias de consumo de esta bebida, ya que entre los indígenas es más frecuente el consumo del pozol maduro o agrío, sobre todo por los hombres que realizan trabajos pesados (peones, campesinos) porque “les da energía para trabajar”. Sin embargo, la mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco, es decir consumen preferentemente el pozol que se preparó el mismo día, el cual aunque no es muy ácido ya presenta un notorio grado de fermentación (Wachter, 1995).

De acuerdo con Steinkraus (2002), el pozol es un ejemplo de cereales fermentados mediante fermentación ácido láctica.

Tabla 1. Ejemplos de alimentos fermentados a base de cereales (Ray & Montet, 2015).

Nombre del producto	Países productores	Sustrato	Microorganismos fermentadores	Características de textura
Ogi	Nigeria, Benin	Maíz, sorgo o mijo	<i>Lactobacillus</i> spp, <i>Aerobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , levaduras y hongos	Líquido (gacha)
Mahewu	Países del este de África	Maíz, sorgo y mijo	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus lactis</i>	Líquido (gacha) / bebida
Mawe	Sur de África y Benin	Maíz	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Líquido (gacha)
Kenkey	Ghana, Botswana	Sorgo, maíz, mijo	<i>Lactobacillus</i> sp., levaduras	Masa (sólido)
Injera	Etiopía, Sudán	Sorgo, tef, maíz, raji	Levaduras, <i>Lactobacillus</i> sp.	Masa (sólido)
Kisra	Sudán, Etiopía	Sorgo	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , levaduras	Masa (sólido)
Dosa	India	Arroz, frijol negro	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Sacharomyces</i> spp.	Masa (sólido)
Dhokla	India, Sri Lanka	Arroz, frijol negro	Bacterias ácido lácticas y levaduras	Masa (sólido)
Idli	India	Arroz, frijol negro	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	
Tarhana	Grecia, Turquía	Trigo, leche (yogurt)	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Masa (sólido)
Uji	Kenia, Uganda, Tanzania	Sorgo, maíz, mandioca	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Bebidas
Boza	Bulgaria, Rumania, Turquía, Albania	Trigo, centeno, mijo, maíz, etc.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Bebida
Bushera	Uganda	Sorgo, mijo	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Bebida
Pozol	México	Maíz	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>	Bebida
Togwa	Este de África	Maíz	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i>	Bebida

2.3.2 Microbiota del pozol

La mayoría de los microorganismos asociados con los granos de maíz utilizados en la elaboración del pozol son destruidos por el tratamiento térmico durante la producción del nixtamal. Por tanto, la inoculación de las masas de maíz tiene lugar durante la molienda del nixtamal y la formación de las bolas de pozol, ya que las personas que elaboran el pozol no toman medidas sanitarias. Debido a esto, las fuentes de inóculo son muy diversas; no obstante, existen varias especies de bacterias, levaduras y mohos que están casi siempre presentes en muestras de pozol, lo que podría estar relacionado con el tipo de sustrato y con las condiciones ambientales que prevalecen en los lugares donde se prepara este alimento (Ulloa *et al.*, 1987; Wachter, 1995; Haard *et al.*, 1999).

Entre los primeros microorganismos aislados del pozol se encuentran *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico *Agrobacterium azotophilum* y *Klebsiella pneumoniae*, responsables del aumento en nitrógeno total del pozol y considerados como benéficos de acuerdo con Ulloa *et al.*, (1987). Estos autores también resaltan la presencia de mohos y levaduras potencialmente patógenos, como *Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum* y *Trichosporon cutaneum* asociados con frecuencia al pozol de pocas horas de fermentación además de *Aspergillus flavus* y *Cladosporium cladosporioides*.

En estudios posteriores realizados por Nuraida *et al.*, (1995) se encontró que la fermentación de pozol era inicialmente realizada por bacterias ácido lácticas, entre las cepas que se identificaron están *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*.

Ampe *et al.*, (1999) estudiaron la microbiología del pozol y encontraron que las BAL representaban del 90 al 97% de la microbiota total activa, descubriendo además que miembros del género *Streptococcus* representaban del 25 al 50% de la microbiota, otros de los organismos encontrados como dominantes fueron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* junto con miembros de los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*.

Las enterobacterias son otro de los grupos microbianos que forma parte de la microbiota del pozol, aunque al inicio de la fermentación se encuentran en concentraciones bajas, crecen bien durante las primeras horas detectándose en bajas concentraciones aún después de 8 días de fermentación (Wacher *et al.*, 2000).

Recientemente se ha estudiado a las bacterias ácido lácticas amilolíticas para comprender el papel que juegan durante la fermentación debido a que el almidón es el principal carbohidrato disponible para la fermentación ácido láctica. Dentro de este grupo se identificaron cepas de *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sulfureus* y *Streptococcus bovis* que se encontró como predominante (Díaz *et al.*, 2003).

2.4 NIXTAMALIZACIÓN

Es un proceso tradicional mexicano desarrollado por las civilizaciones mesoamericanas. El tratamiento térmico alcalino al cual se somete el maíz da como producto central la masa, la cual, luego se transforma en diversas formas. El proceso sigue el diagrama de flujo mostrado en la Figura 2.

En este proceso se mezclan una parte de maíz entero y aproximadamente dos partes de solución al 1% de cal. La mezcla se calienta a 80 °C durante 20 a 45 minutos con alguna agitación dejándola reposar durante la noche. Al día siguiente el agua de remojo, de color amarillo lechoso, se descarta y el maíz remojado se lava dos o tres veces con agua limpia, removiendo la cáscara y eliminando el exceso de cal y las impurezas que el grano pudiera tener. Los granos de maíz cocidos de esta forma, denominados “nixtamal”, son entonces molidos obteniéndose una masa suave (Méndez *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008).

La masa obtenida del proceso de nixtamalización es una red de polímeros de almidón dispersos y solubles; gránulos de almidón parcialmente gelatinizados en una fase acuosa continua sostenidos por gránulos de almidón libres, otras partes de endospermo y lípidos (Jiménez, 2012).

Durante la conversión de maíz en masa, ocurren pérdidas de materia seca debido a la eliminación del pericarpio, a la destrucción parcial y solubilización de las

paredes celulares del endospermo externo. Las pérdidas de materia seca depende de diversas variables, tales como el tipo de maíz, la adición de agua y de hidróxido de calcio, el tiempo de cocción, el período de remojo, el lavado del nixtamal y la acción de la molienda (Rodríguez *et al.*, 2008).

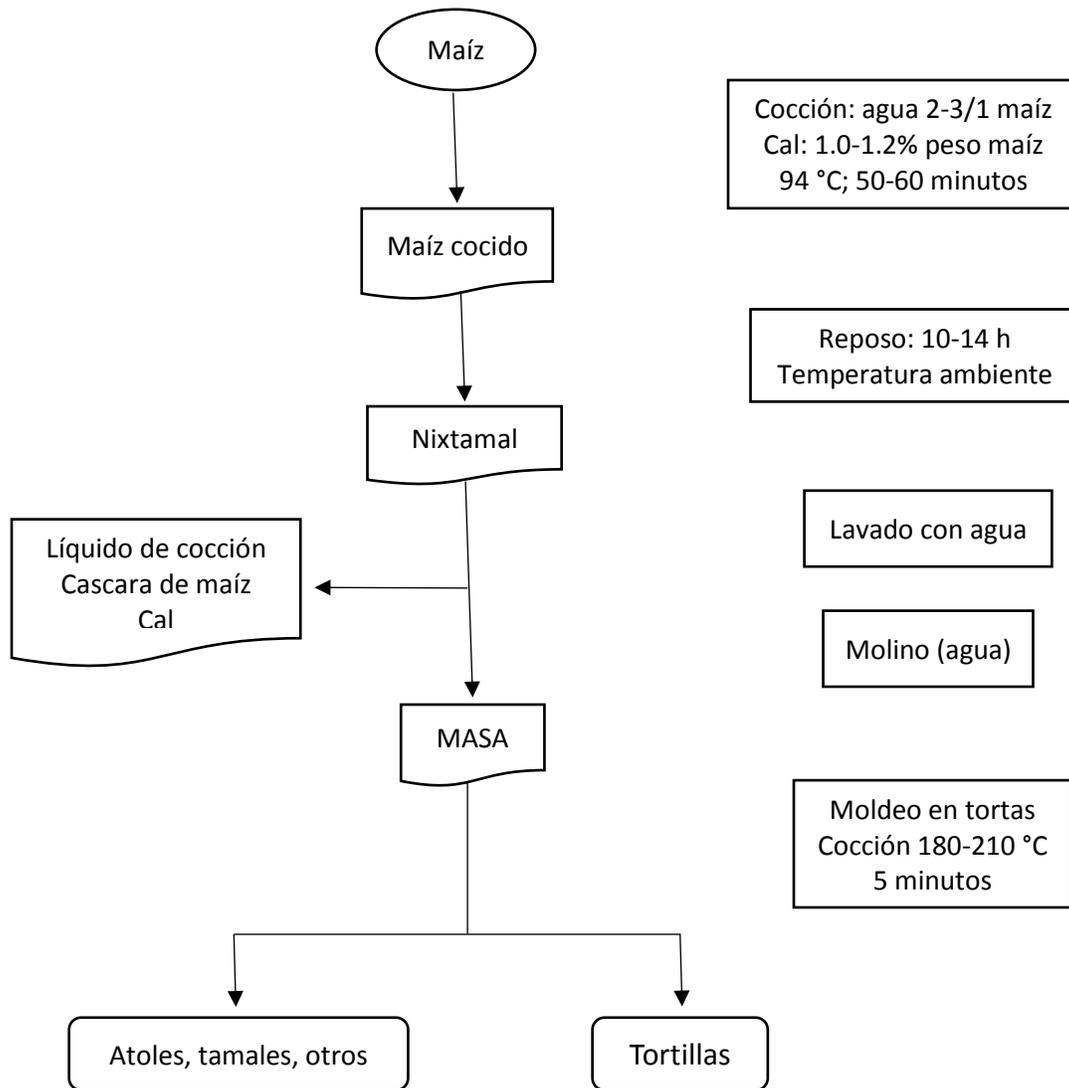


Figura 2. Nixtamalización de maíz y preparación de tortillas (Rodríguez *et al.*, 2008).

El proceso de nixtamalización tiene un efecto en el aroma, el sabor y el color del producto, y controla la actividad microbiológica (Rodríguez *et al.*, 2008), ya que se ha observado que los mohos presentes en los granos de maíz, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium moniliforme*, se destruyen durante el tratamiento

térmico alcalino (Ulloa *et al.*, 1987) y no se detectan microorganismos después de la cocción en agua con cal, ocurriendo la inoculación de la masa durante la molienda del nixtamal (Wacher, 1995).

La cocción alcalina del maíz por períodos de tiempo de alrededor de 60 minutos asociada al remojo en medio alcalino induce el hinchamiento y debilitamiento de la pared celular y de los componentes de la fibra, esto permite y facilita la eliminación del pericarpio que se remueve fácilmente frotando y lavando el grano. Su eliminación facilita la absorción de agua y de calcio, ya que representa la primera barrera a este proceso (Rodríguez *et al.*, 2008).

El contenido de agua en el grano generalmente de 12 a 14% aumenta a valores de 42-46% en el nixtamal y llega a su máximo valor durante el periodo de remojo, entre 45 a 49%. Los iones de calcio son acarreados por el agua al penetrar al grano, sin embargo su absorción es más lenta que la del agua. El germen absorbe más agua que el endospermo y en esta fracción del grano el calcio se liga con el almidón (ídem).

Los gránulos de almidón aumentan de tamaño en todo el endospermo, muestran una destrucción parcial y el almidón se encuentra parcialmente gelatinizado. Las proteínas de esta estructura del grano quedan asociadas a los gránulos de almidón, sin embargo ocurren cambios en la apariencia física de los cuerpos proteicos (ídem).

El tratamiento térmico alcalino aplicado al maíz para convertirlo en masa o tortilla contribuye a reducir los riesgos de desarrollar pelagra, por mecanismos que aun hoy en día no están bien esclarecidos. Favorece la biodisponibilidad del ácido nicotínico ligado mediante hidrólisis y mejora el balance de aminoácidos, incrementando la utilización del triptófano y reduciendo la disponibilidad de la leucina (ídem).

Además se ha encontrado que durante la nixtamalización el ácido fítico se reduce un 35% y se favorece la utilización del hierro debido posiblemente a que la cantidad de calcio presente es tan alta en comparación con el contenido de ácido fítico que lo puede saturar fácilmente, evitando así su combinación con el hierro (Urizar & Bressani, 1997).

2.5 MAÍZ

El maíz (*Zea mays*) es una planta de cultivo alto (1-4 m) con hojas largas (50-100 cm) y anchas (5-10 cm) y un extenso sistema radicular fibroso. Botánicamente, es una gramínea anual que pertenece a la familia Poaceae (Wusirika *et al.*, 2014).

Fue domesticado a partir de su antepasado silvestre, el teocintle, hace unos 6,500 a 9,500 años en las zonas montañosas de México. La extensa genética y diversidad fenotípica del maíz primitivo facilitó su rápida expansión a través de América (Jiménez, 2012).

Es uno de los principales cereales del mundo junto con el arroz y trigo. Representa cerca del 15-56% del total de las calorías diarias en la dieta de personas de aproximadamente 25 países en desarrollo, particularmente de África y América Latina donde la proteína animal es escasa, cara y por tanto inasequible para un gran sector de la población. Estados Unidos es el mayor productor de maíz, con 316 millones de toneladas de maíz cosechado, 37% de la producción mundial de maíz (Arendt & Zannini, 2013).

Los polisacáridos, proteínas y lípidos representan los tres componentes mayoritarios de los granos de maíz. Un grano de maíz común está compuesto por 70-75% de almidón, 8-10% de proteína, 4-5% de lípidos, 1-3% de azúcares y 1-4% de cenizas (ídem).

E. L. Sturtevant clasificó al maíz en seis subespecies o tipos:

-Maíz dentado (*Zea indentata*): en éste, el endospermo córneo se encuentra principalmente en los bordes del grano mientras que el endospermo suave o blanco en el centro y la coronilla. Durante la maduración, el endospermo suave se contrae más rápido que el endospermo córneo y provoca una abolladura y un arrugamiento o plegamiento más o menos irregular de la capa de la semilla en la coronilla del grano.

-Maíz pedernal (*Zea indurata*): se diferencia del maíz tipo dentado en que el endospermo suave se encuentra en el centro del grano rodeado por el endospermo córneo.

-Maíz suave (*Zea amyloacea*): puede ser fácilmente reconocido por la ausencia de endospermo córneo, todo el interior del grano además del germen está compuesto

de endospermo amiláceo y suave. Variedades de este tipo son cultivadas comúnmente en varios países del Centro y Sur de América donde se proporciona una larga temporada de crecimiento. El color varía ampliamente, siendo los más comunes blanco, azul y negro.

-Maíz dulce (*Zea sacchrata*): se caracteriza por el aspecto traslúcido y córneo del endospermo y la apariencia arrugada del grano maduro. El almidón se convierte principalmente en azúcares simples (sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa).

-Maíz palomero (*Zea everta*): en este tipo todo o casi todo el endospermo es córneo y muy duro.

-Maíz de vaina (*Zea tunicata*): este tipo es caracterizado por espigas de tamaño mediano a pequeño, en el que no solo la mazorca está cubierta por una vaina, ya que cada grano también se encuentra envuelto por vainas. Se piensa que éste es el maíz primitivo o el tipo original a partir del cual otros maíces se han desarrollado (Shoesmith, 1918).

2.5.1 Estructura del grano de maíz

Las diferentes coloraciones de los granos pueden deberse a las diferencias genéticas del pericarpio, la aleurona, el endospermo y el germen.

La mazorca normalmente contiene 800 semillas unidas en hileras, envuelta por vainas de hojas modificadas.

Cariópside: el fruto de maíz es una cariópside en la que la pared del ovario maduro (pericarpio) no se separa naturalmente de la semilla y está unida a la mazorca por el pedicelo que asegura la transferencia de los productos de fotosíntesis al núcleo en crecimiento. Cuando se retira la cariópside de la mazorca, el pedicelo se rompe y a la estructura cónica que permanece unida a la cariópside se le llama “tapa de la punta” (ver Figura 3).

Pericarpio: la estructura más externa del grano es el pericarpio, éste aporta el color del grano y representa cerca del 5-6% del peso seco de todo el grano. Todas las partes del pericarpio están formadas de células muertas que son tubos celulósicos.

Aleurona: capa externa que cubre todo el endospermo y germen actuando como una membrana semipermeable que restringe el flujo de moléculas grandes al interior

y exterior del endospermo. Está compuesta por grandes células densas, ricas en minerales y proteínas de alta calidad. Estas proteínas no están disponibles para las enzimas digestivas, a menos que las células sean abiertas por la molienda.

Endospermo: comprende 82-84% del peso seco de todo el grano y representa una fuente de almidón (86-89% en base seca) y la mayor parte de proteína disponible (7-10% en base seca). Está constituido por células alargadas que contienen gránulos de almidón encerrados en una matriz proteica. La región estrecha entre los gránulos de almidón se llena con cuerpos proteicos incrustados en la proteína de la matriz.

Germen: es la planta embrionaria, normalmente abarca 1/2 a 2/3 de la longitud del grano extendiéndose desde la punta de éste.

Embrión: constituye la parte viva del grano de maíz, está completamente rodeado por el escutelo que actúa como su órgano nutritivo. Las paredes de las células del escutelo son gruesas y contienen numerosos orificios y espacios intercelulares que facilitan el movimiento de material entre las células. Constituye 11% del peso seco del grano de maíz. Contiene 83% de los lípidos, 70% de los azúcares, 78% de los minerales, 26% de las proteínas (en particular, hormonas que se movilizan durante la germinación) del grano y vitaminas (Arendt *et al.*, 2013).

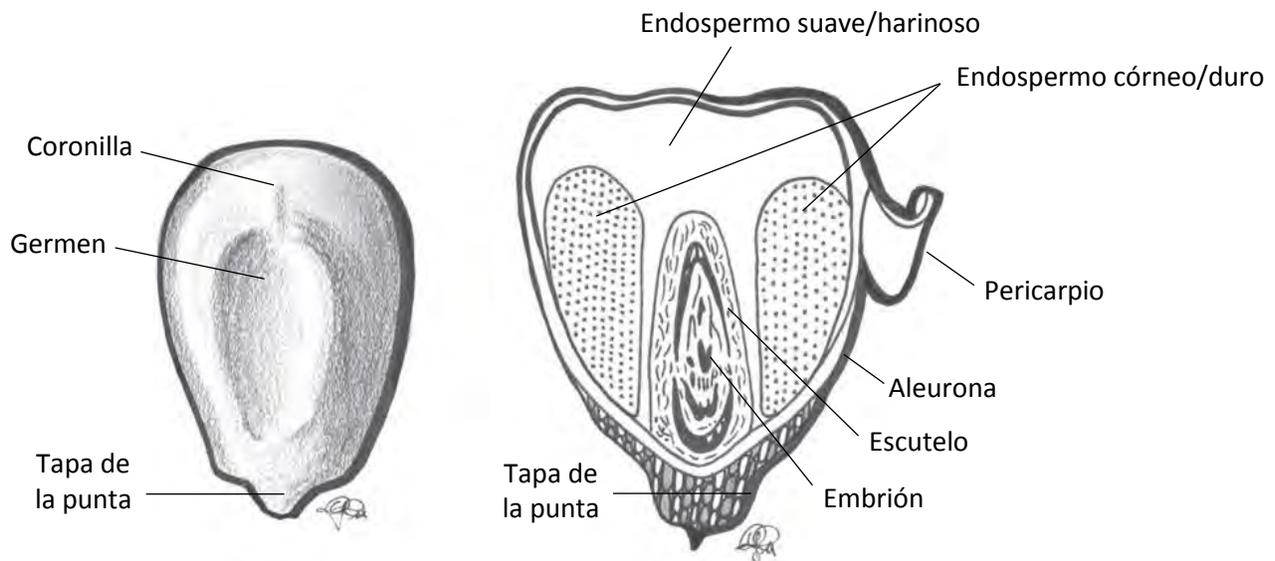


Figura 3. Un grano de maíz en sección transversal longitudinal, mostrando las partes que lo componen (Arendt *et al.*, 2013).

2.6 ALMIDÓN

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas y proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual.

La mayoría de los gránulos del almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y otro muy ramificado llamado amilopectina (Fennema, 1995).

2.6.1 Amilosa

La amilosa es una cadena lineal constituida principalmente por una cadena lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1 \rightarrow 4), aunque también existen moléculas que poseen algunas ramificaciones en posición (1 \rightarrow 6), alrededor de una ramificación cada 180-320 unidades.

El acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades α -D-glucopiranosido con enlaces (1 \rightarrow 4) en las cadenas de amilosa da a las moléculas una forma de hélice o espiral con giro a la derecha. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice.

La mayoría de los almidones contiene alrededor de 25% de amilosa (ídem).

2.6.2 Amilopectina

Es una molécula muy grande y altamente ramificada, con enlaces de ramificación que constituyen alrededor del 4-5% del total. Consiste en una cadena que contiene el único extremo reductor, denominada cadena-C, la cual tiene numerosas ramas, llamadas cadenas-B, a las que se unen por su parte varias cadenas-A. Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices.

La amilopectina está presente en todos los almidones, constituyendo alrededor de 75% de los almidones más comunes. Algunos almidones están formados exclusivamente por amilopectina y se les conoce como almidones céreos (ídem).

2.6.3 Gránulos de almidón

Los gránulos de almidón están formados por moléculas de amilosa y/o amilopectina ordenadas de forma radial. Contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternadas. Las ramas agrupadas en paralelo de la amilopectina se encuentran plegadas como dobles hélices. Es este empaquetamiento de las estructuras en doble hélice lo que forma las muchas áreas cristalinas pequeñas muy densas que alternan con las menos densas y amorfas.

Las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina y algunas pueden difundir a partir de gránulos parcialmente embebidos de agua (ídem).

2.7 GELATINIZACIÓN

Cuando el almidón se calienta en presencia de agua, sufre una transición irreversible de orden-desorden denominada gelatinización. Durante esta transición se observan varios cambios: hinchamiento de los gránulos, absorción de agua, pérdida de la cristalinidad y lixiviación de la amilosa. Se han usado muchas técnicas para estudiar estos eventos en un intento por comprender los cambios estructurales precisos involucrados en la gelatinización. Entre las técnicas utilizadas están DSC, difracción de rayos X, microscopía óptica, análisis termomecánico y resonancia magnética nuclear (Eliasson, 2004).

Debido a que la gelatinización del almidón es un proceso endotérmico, es muy utilizada la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), que mide tanto la temperatura como la entalpía de gelatinización. La descripción general de los acontecimientos que tienen lugar a lo largo del proceso de gelatinización se presenta a continuación. El agua actúa como un plastificante. Su efecto favorecedor de la movilidad es llevado a cabo en primer lugar en las regiones amorfas que físicamente tienen la naturaleza de un vidrio. Cuando los gránulos de almidón se calientan en presencia de suficiente agua (al menos 60%) y se alcanza una temperatura específica (T_g) las regiones amorfas plastificadas del gránulo sufren una transición de fase de un estado de vidrio a otro de goma. Sin embargo, el pico de absorción de energía asociado con esta transición a menudo no se detecta por DSC, ya que las regiones de cristalinidad, es decir, las ramas en doble hélice de

amilopectina ordenadas y empaquetadas, son contiguas y están conectadas por enlaces covalentes a las regiones amorfas, y así la fusión de los cristales sigue inmediatamente a la transición vítrea. Puesto que la entalpía de fusión inicial es mucho mayor que la de transición vítrea, esta última normalmente no se hace evidente (Fennema, 1995).

La entalpía de gelatinización del almidón granular representa cantidades termodinámicas netas de diferentes eventos: hinchamiento granular y fusión cristalina (endotérmicos), hidratación y reordenamiento de las cadenas (exotérmico) (BeMiller & Whistler, 2009).

El agua juega un papel importante en el proceso térmico de gelatinización del almidón. Cuando se incrementa la humedad de suspensiones de almidón disminuye la temperatura de gelatinización. Adicionalmente la presencia de álcali, sales, azúcares, lípidos, alcohol, ácidos orgánicos y sus sales también influyen en la gelatinización del almidón mediante la ruptura de enlaces de hidrógeno en el interior del gránulo de almidón o mediante la formación de complejos solubles con el almidón, teniendo un impacto en la temperatura de gelatinización, afectando así el grado de gelatinización (Li *et al.*, 2015).

2.8 RETROGRADACIÓN

Este fenómeno se define como la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan de forma paralela y reaccionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidroxilos.

Cada almidón tiene una tendencia diferente a la retrogradación, lo cual se relaciona con su contenido de amilosa. Es más difícil que la amilopectina la desarrolle, debido a que sus ramificaciones impiden la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes; sin embargo, si las soluciones de almidón se congelan y se descongelan continuamente, se produce su insolubilización. Las fracciones de amilosa o las secciones lineales de amilopectina que retrogradan forman zonas con una organización cristalina muy rígida, la cual requiere alta energía para romperse y permitir la gelatinización del almidón (Badui, 2006).

2.9 MICROCALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (μ DSC)

La microcalorimetría es una técnica experimental que permite determinar con alta sensibilidad la energía expuesta como consecuencia de cualquier proceso o transformación (Lago *et al.*, 2016). En la calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés), la muestra y el material de referencia son calentados mediante elementos calefactores individualmente. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Hay que tener en cuenta que este sistema está dividido en dos bucles distintos, como se muestra de forma esquemática en la Figura 4. Uno de estos bucles controla la temperatura media, de forma que las temperaturas T_p de la muestra y de la referencia aumentan a una velocidad predeterminada, que es registrada. El segundo bucle tiene como función asegurar el que si se produce una diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia (debido a una reacción exotérmica o endotérmica en la muestra) se modifique la potencia de entrada a fin de anular esta diferencia. En esto consiste el principio de “balance nulo” de temperatura. De este modo, las temperaturas de las celdas se mantienen iguales mediante un ajuste continuo y automático de flujo de calor. La señal producida, proporcional a la diferencia de calor de entrada a la muestra y a la referencia, dH/dt , se registra. En la práctica, también se registran las temperaturas medias de la muestra y de la referencia (McNaughton & Mortimer, 1975).

Los cambios endotérmicos y exotérmicos en un termograma de DSC revelan transiciones o reacciones que ocurrieron durante la prueba, por ejemplo, transición vítrea, gelatinización y fusión. De esta forma puede proporcionar directamente la temperatura y entalpía de transición/reacción. En el estudio del almidón, el análisis de datos de DSC brinda información adicional referente a éste, por ejemplo, su estructura y composición, interacción con otros componentes, los efectos del agua y propiedades relacionadas (Zhong & Sun, 2005).

En la Figura 5 se muestra un termograma ideal que representa la evolución del calor diferencial de entrada dH/dt , frente a la temperatura.

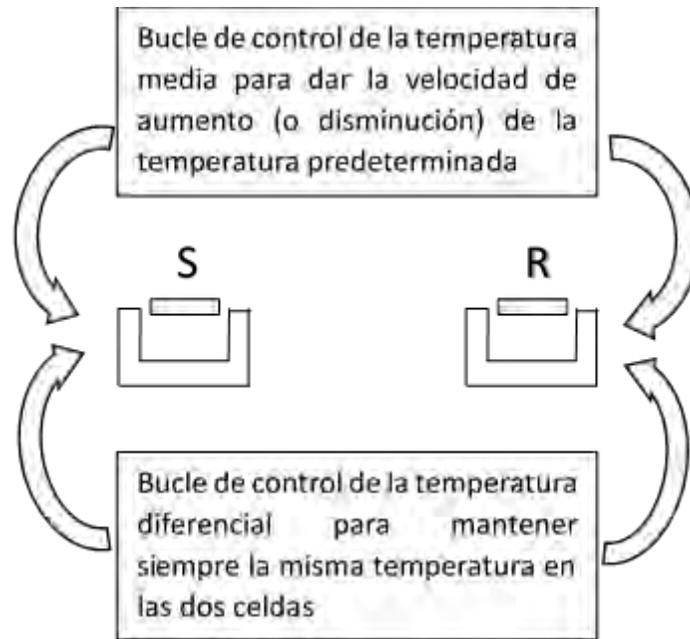


Figura 4. Representación esquemática de los bucles de control del DSC, donde S representa la celda de la muestra y R la celda del material de referencia (McNaughton & Mortimer, 1975).

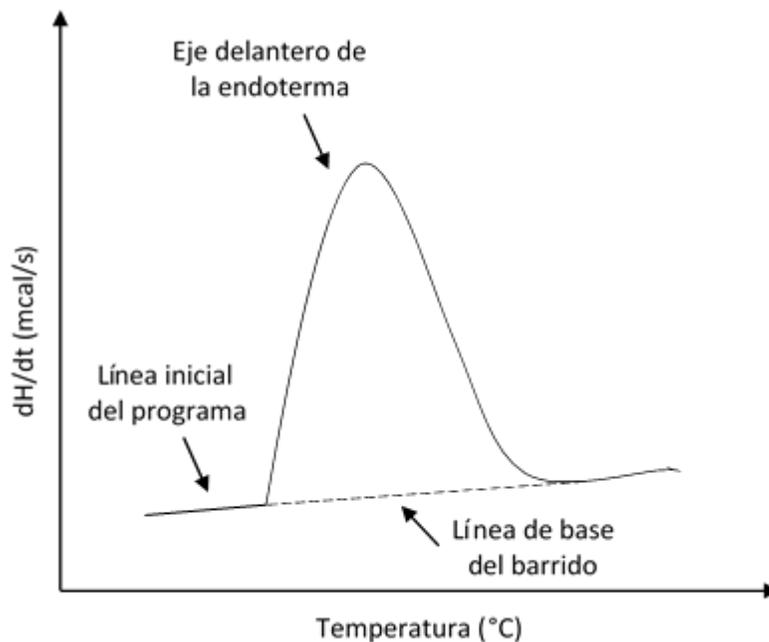


Figura 5. Termograma ideal de DSC (McNaughton & Mortimer, 1975).

A continuación se presentan ejemplos del uso de esta técnica en el estudio de cereales:

- Estudio de los efectos de la temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad de los granos de maíz sobre las propiedades térmicas, temperatura y entalpía de desnaturalización de las fracciones proteicas de éstos (Sánchez *et al.*, 2003).
- Determinación del contenido de amilosa en almidón de trigo, centeno, cebada y maíz (Moorthy *et al.*, 2006).
- Caracterización térmica de una formulación de cereales de desayuno lista para el consumo y de sus principales componentes amiláceos realizando el análisis bajo condiciones de exceso de agua y variando la proporción de agua dentro del intervalo esperado en un proceso de extrusión, entre 10 y 36% de agua (Núñez *et al.*, 2009).
- Estudio del efecto del tiempo de cocción y de la concentración de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ utilizada en la cocción de maíz para la obtención de harinas de maíz, sobre la gelatinización de almidón de harinas de maíz (Coral, 2010).
- Efecto de la adición de xantana en la elaboración de pan blanco durante el almacenamiento del pan, por medio de la evaluación de la estabilidad térmica del pan, para retardar el envejecimiento (Gosset, 2015).
- Evaluación de los cambios en las propiedades térmicas del almidón de maíz durante la nixtamalización y el proceso de elaboración de tortilla, y su relación con la dureza del grano (Santiago-Ramos *et al.*, 2017).

3. HIPÓTESIS

Ya que existen bacterias lácticas amilolíticas en la masa de nixtamal durante su fermentación natural utilizarán el almidón presente para su crecimiento, esto provocará cambios en su estructura y modificará sus propiedades térmicas.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer los cambios en las transiciones térmicas de masa de nixtamal causados por su fermentación natural mediante un análisis térmico con microcalorimetría diferencial de barrido y estudiar los cambios en los principales grupos microbianos presentes naturalmente en la masa de nixtamal durante el proceso fermentativo.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener la composición microbiológica de una masa de nixtamal para pozol mediante las cuentas en placa de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, microorganismos xilanolíticos, microorganismos mesófilos aerobios no lácticos, enterobacterias, mohos y levaduras con el fin de saber cómo se desarrollan con el tiempo de fermentación.
- ❖ Examinar la diversidad de microorganismos xilanolíticos presentes en la masa de nixtamal mediante su descripción colonial y microscópica.
- ❖ Detectar el consumo de carbohidratos durante el proceso fermentativo, mediante la determinación de la concentración de carbohidratos solubles totales y carbohidratos reductores, y estudiar su relación con las transiciones térmicas de la masa de nixtamal.
- ❖ Obtener las características de las muestras mediante la determinación del pH, la acidez titulable y la humedad así como sus cambios asociados con la fermentación.

5. METODOLOGÍA

5.1 Muestra de estudio

Se trabajó con masa de nixtamal procedente del mercado de Atasta en Villahermosa, Tabasco. Se tomó una muestra de la masa recién molida y amasada, se envolvió en bolsas de plástico estériles y se envió por avión a la Ciudad de México.

5.2 Metodología general

Una vez que la masa llegó al laboratorio, se amasó dentro de las bolsas en que fue enviada para homogenizarla, se midió pH y humedad para conocer sus características, posteriormente se dividió en lotes de 500 g que se colocaron en bolsas de plástico Stomacher estériles y así facilitar su manipulación posterior, se mantuvieron en refrigeración a 6 °C por 15 h hasta iniciar la fermentación.

Se colocaron 100 g de muestra directamente de las bolsas Stomacher en frascos de vidrio previamente esterilizados y con ayuda de una cuchara flameada se compactó la masa de tal forma que no quedaran huecos de aire, después se taparon con papel aluminio y se aseguraron con ligas. La masa se manipuló en una campana de flujo laminar. Los frascos se incubaron a 30 °C y se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 96 y 144 h de fermentación

Se realizaron dos fermentaciones cada una con un lote diferente de masa, obtenidos con el mismo proveedor. La primera fermentación se realizó del 6/10/2016 al 12/10/2016 y la segunda se realizó del 30/11/2016 al 6/12/2016.

En la primera fermentación se realizó la cuenta viable de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido lácticas amilolíticas (BAAL), xilanolíticos, mesófilos aerobios no lácticos, enterobacterias, mohos y levaduras, a los microorganismos que mostraron actividad xilanolítica en las placas se les hizo una descripción colonial y microscópica; se midió pH, acidez y humedad, se tomaron muestras para medir la concentración de carbohidratos solubles totales y carbohidratos reductores, y se realizó una réplica del análisis térmico.

En la segunda fermentación además de la segunda réplica del análisis térmico, se realizó la cuenta viable de BAL por ser el principal grupo responsable de la fermentación, de BAAL por estar relacionadas con la actividad amilolítica y de mesófilos aerobios no lácticos para verificar las cuentas obtenidas en la primera fermentación también se midió pH, acidez y humedad para corroborar que la fermentación se había desarrollado de forma similar en las muestras utilizadas en las dos réplicas del análisis térmico.

En la Figura 6 se presenta un diagrama con la metodología general seguida.

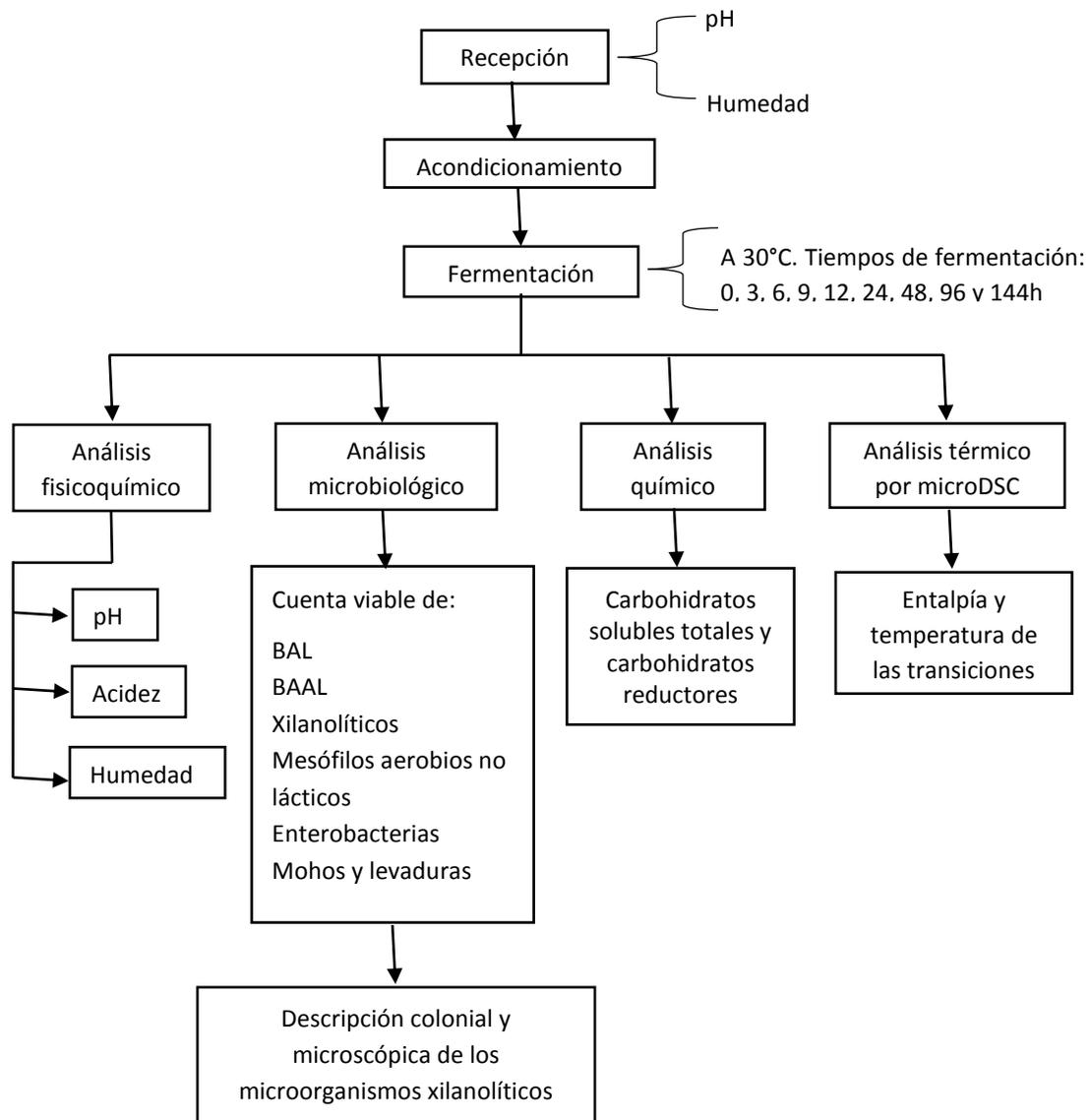


Figura 6: Diagrama experimental general.

5.3 Análisis fisicoquímico

5.3.1 Determinación de humedad

Se colocó 1 g de muestra en una termobalanza (MB45, OHAUS®, USA) a 100 °C durante 20 minutos y se registró directamente el porcentaje de humedad al final de la determinación. La determinación se realizó por triplicado para cada tiempo.

Para la determinación de pH y acidez se pesaron 10 g de muestra, se agregaron 90 mL de agua destilada y se disolvió la muestra. Después de medir pH se procedió a determinar su acidez.

5.3.2 Determinación de pH

Se determinó pH para cada tiempo de fermentación estudiado, por triplicado. La medición de pH de las muestra se realizó con un potenciómetro calibrado (pH 700, OAKTON®, Singapore).

5.3.3 Determinación de acidez

A cada muestra disuelta previamente, se le adicionaron dos gotas de fenolftaleína al 1% y se valoró con NaOH 0.1 N hasta el vire a color rosa tenue. La determinación de acidez se realizó por triplicado y se expresó en g ácido de láctico por cada 100 g de masa.

5.4 Análisis químico

5.4.1 Concentración de carbohidratos solubles totales

Se determinó por el método fenol-sulfúrico (Nielsen, 2010), midiendo la absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer Thermoscientific, China). La curva patrón se realizó con dextrosa en un intervalo de concentración de 10-90 µg/mL (datos disponibles en Anexo, Tabla A).

5.4.2 Concentración de carbohidratos reductores

Se determinó por el método ácido dinitrosalicílico-DNS (Saqib & Whitney, 2011), midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer Thermoscientific, China). La curva patrón se realizó con dextrosa

en un intervalo de concentración de 0.1-0.5 mg/mL (datos disponibles en Anexo-Tabla B). Tanto la concentración de carbohidratos solubles totales como de carbohidratos reductores se realizaron por triplicado.

5.5 Análisis microbiológico

5.5.1 Cuentas viables

En una bolsa estéril Stomacher se pesaron 25 g de masa de maíz nixtamalizado y se adicionaron 225 mL de agua peptonada para su posterior homogenización durante 60 s a velocidad normal en un Stomacher (Laboratory Blender, Stomacher 400, England). De esta primera dilución se hicieron diluciones seriadas. La cuenta viable de cada grupo microbiano (bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, xilanolíticos, mesófilos aerobios no lácticos, enterobacterias, mohos y levaduras) se determinó por medio de inoculación en placas de agar de tres diluciones seriadas por duplicado para cada dilución.

En la Tabla C se muestran los medios de cultivo y las condiciones de incubación (ver anexo).

Para contabilizar los microorganismos con actividad xilanolítica, las placas se revelaron cubriéndolas con rojo congo al 0.2%, y dejándolas en agitación en un RotoMix (Type 50800, Barnstead Thermolyne, USA) durante 10 minutos, después se retiró el excedente y se hicieron 3 lavados con NaCl 1 M en agitación por 10 minutos. Se consideraron como xilanolíticas aquellas colonias que presentaban un halo claro.

Para contabilizar las bacterias ácido lácticas amilolíticas se cubrieron las placas con lugol y se consideraron como BAAL aquellas colonias que presentaron un halo traslúcido a su alrededor.

5.5.2 Descripción colonial y microscópica

Después de realizar la descripción colonial se hizo tinción de Gram (Ramírez *et al.*, 2008) de los microorganismos que presentaron halo de degradación en el medio de cultivo MRS-X.

5.6 Análisis térmico empleando μ DSC

Para realizar la prueba se colocó una masa total aproximada de 660.0 mg de masa de maíz nixtamalizado-agua destilada, dividida en 4 capas masa/agua/masa/agua en proporción 1:1 en una celda de Hastelloy C276 y como referencia se utilizó la misma masa de agua destilada. Después de sellar las celdas se calentaron de 25 a 120 °C y en seguida se enfriaron de 120 a 25 °C en un ciclo de calentamiento-enfriamiento a una tasa de 1.0 °C/min en un microcalorímetro (μ DSC 7 evo, Setaram, Caliure, France).

La prueba se realizó por duplicado para cada día de fermentación estudiado. Las temperaturas inicial (T_i), pico (T_p) y final (T_f) así como las entalpías de las transiciones observadas se obtuvieron con el software DataCalisto (Setaram, Caliure, France) integrando el área bajo la curva, tomando como referencia la primera derivada (Figura 7).

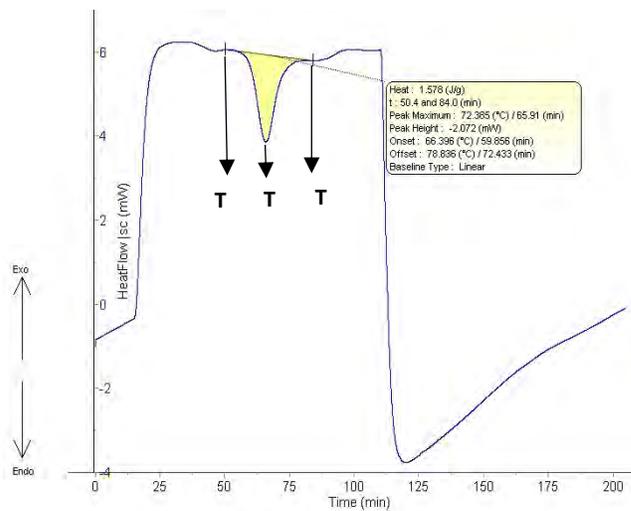


Figura 7. Termograma que muestra las temperaturas T_i , T_p y T_f de la transición correspondiente a una muestra de la primera fermentación.

5.7 Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias significativas en los parámetros T_i , T_p , T_f , ΔT y ΔH con el tiempo de fermentación, se realizó un análisis de varianza de un factor a un nivel de 95% de confianza y en los casos en que se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a un $\alpha=0.05$, para ello se utilizó el software Microsoft Excel® 2013.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron dos fermentaciones, cada una con un lote diferente de muestra, ambos obtenidos con el mismo proveedor.

6.1 Primera fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado

El lote con el que se realizó la primera fermentación tenía un pH de 6.89 ± 0.28 y una humedad de $51.81 \pm 0.71\%$.

6.1.1 Microbiota natural

Al inicio de la fermentación las BAL, las BAAL, los xilanolíticos y los mesófilos aerobios no lácticos estaban presentes en concentraciones altas, entre 10^8 y 10^9 ufc/g, mientras que las levaduras y enterobacterias estuvieron en concentraciones menores, 3.5×10^4 y 7.9×10^6 ufc/g respectivamente (Figura 8). De forma similar a lo obtenido por Wachter *et al.* (2000), quienes al examinar la microbiota inicial de masas de nixtamal recién preparadas observaron que las bacterias ácido lácticas y los mesófilos aerobios no lácticos se encontraban en concentraciones mayores respecto a las enterobacterias, mohos y levaduras.

Durante las primeras 3 horas de fermentación se observó un periodo de adaptación de las BAL y las BAAL. Esta es seguramente la causa por la cual las bacterias lácticas no metabolizaron los azúcares en ácido láctico o no de manera significativa, pues durante este tiempo la concentración de carbohidratos reductores se mantuvo constante, en 3.8 mg glucosa/g, y aunque se observó un ligero incremento de acidez no fue considerable, ya que el pH no disminuyó (Figura 9). Sin embargo, como se observa en la Figura 10, durante este período la concentración de carbohidratos solubles totales se duplicó, esto posiblemente indica que hubo actividad amilolítica, ya que la concentración de mono y disacáridos que se encuentra en la masa de nixtamal no sería suficiente para sostener la alta concentración de bacterias y la diversidad microbiana que se han reportado en el pozol (Díaz *et al.*, 2003) y por lo tanto el almidón representa una fuente de carbono importante para la fermentación (Ben Omar & Ampe, 2000), es posible que los microorganismos xilanolíticos

presentes (Figura 8) también hayan participado en el incremento de la concentración de carbohidratos solubles totales.

A las 6 horas de fermentación se observó un aumento en la concentración de las bacterias lácticas, las bacterias lácticas amilolíticas, las enterobacterias y las levaduras. De estos grupos las BAL fueron las que tuvieron un crecimiento mayor, ya que incrementaron 13.5 veces su concentración inicial, seguidas por las BAAL quienes la incrementaron 5.5 veces. Durante este crecimiento la acidez de la masa se triplicó alcanzando una concentración de 0.3% de ácido láctico, ocasionando que el pH disminuyera de 6.6 a 5.3.

Después de esta etapa de crecimiento se observó una caída en la cuenta de bacterias lácticas a las 9 horas de fermentación, las cuales disminuyeron de 3.7×10^9 ufc/g a 1.2×10^9 ufc/g, pero 3 horas después recuperaron la cuenta que habían alcanzado a las 6 horas de fermentación. En el caso de las BAAL también se observó una caída, llegando a 2.9×10^8 ufc/g a las 9 h y se mantuvieron en esta concentración hasta las 12 horas de fermentación.

A las 24 h las bacterias lácticas alcanzaron una concentración máxima de 1.5×10^{10} ufc/g. Aunque después de este tiempo su cuenta cayó progresivamente hasta llegar a 5.4×10^8 ufc/g al sexto día de fermentación, su concentración se mantuvo por encima de la de los demás grupos microbianos. Esta predominancia, en la cuenta, de bacterias lácticas sobre los demás grupos microbianos, se ha observado anteriormente en estudios realizados sobre la microbiota del pozol (Nuraida *et al.*, 1995; Wachter *et al.*, 2000). Las bacterias lácticas amilolíticas alcanzaron una concentración máxima de 3.3×10^9 ufc/g también a las 24 h, después su cuenta cayó de una manera más pronunciada que la de las BAL, llegando a 7.3×10^6 ufc/g a los 6 días de fermentación. Posiblemente, este comportamiento se debe a la sensibilidad al pH que presentan ciertas cepas amilolíticas aisladas del pozol, puesto que se ha observado que *Streptococcus bovis* A12203 y *Streptococcus macedonicus* A45201 dejan de crecer cuando el pH disminuye a valores cercanos a 5 (López, 2005). La presencia de BAAL durante la fermentación de masa de nixtamal se ha documentado en estudios anteriores, en los cuales se han reportado altas concentraciones y se ha encontrado a *Streptococcus bovis* como la especie

predominante, que es amilolítica y cuyo papel principal podría ser proporcionar maltooligosacáridos de bajo peso molecular a la microbiota no amilolítica al inicio de la fermentación (Ben Omar & Ampe, 2000; Díaz *et al.*, 2003).

Las cuentas viables de los grupos microbianos estudiados se pueden consultar en la Tabla E en Anexos.

La presencia de enterobacterias en este alimento se debe a la contaminación que ocurre durante la molienda del nixtamal para la obtención de la masa ya que no se hace una limpieza adecuada del equipo de molienda, quedando restos de masas de moliendas anteriores a través de los cuales ocurre la inoculación de estas bacterias entéricas junto con los demás grupos microbianos observados (Wacher *et al.*, 1993).

Al inicio de la fermentación las enterobacterias se encontraban en concentraciones de 7.9×10^6 ufc/g y crecieron durante las primeras 12 h alcanzando una concentración de 3.6×10^8 ufc/g. A partir de las 24 h se observó una disminución en su concentración que se prolongó hasta el sexto día de fermentación. Ésta puede deberse al efecto combinado de diferentes factores que se ha visto afectan el desarrollo de bacterias Gram negativas, tales como: generación de compuestos antimicrobianos durante el metabolismo de bacterias lácticas, como H_2O_2 , diacetilo, ácido acético y ácido láctico (James, 1982; Omemu & Faniran, 2011; Linley *et al.*, 2012; Corsetti *et al.*, 2015; Stanojević-Nikolić *et al.*, 2016); reducción del pH pues a las 24 h ya se había alcanzado el pH mínimo que toleran enterobacterias como *Salmonella Typhi*, *Shigella* spp. y *E. coli* (Mensah, 1997); producción de bacteriocinas (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2016).

Aunque se observó una importante disminución en la cuenta de las enterobacterias, una parte de estas bacterias sobrevivió a las condiciones ácidas desarrolladas durante la fermentación, ya que al sexto día cuando se había alcanzado un pH de 3.36 y una acidez de 1.26% se detectaron en concentraciones de 2.5×10^3 ufc/g. Una enterobacteria *Klebsiella pneumoniae*; se ha reportado como fijadora de nitrógeno en la fermentación (Ulloa *et al.*, 1987), por lo que esta sobrevivencia podría ser una de las razones para que se presente este fenómeno en el pozol. La persistencia de enterobacterias en pozol fermentado se ha observado en estudios

realizados por Sainz *et al.*, 2001 y Jiménez *et al.*, 2010, en los que incluso después de 12 días de fermentación se detectaron coliformes totales en concentraciones de 2.2 log ufc/g. Sin embargo, se ha observado que diferentes productos fermentados a base de cereales tienen un efecto inhibitorio sobre patógenos entéricos como *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *E. coli* enterotoxigénica (Mbugua & Njenga, 1991; Mensah *et al.*, 1991).

Bacterias lácticas tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus infantarius* producen ácidos y son resistentes a ellos (Ben Omar & Ampe, 2000; tesis de doctorado de Domínguez-Ramírez, en proceso), las enterobacterias son sensibles a los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas como mencionado anteriormente y aunque también se ha reportado la presencia de enterobacterias resistentes a valores bajos de pH (Ampe *et al.*, 1999), es posible que su crecimiento se deba también a la presencia de microambientes creados por el crecimiento de levaduras que consumen ácidos (Nuraida *et al.*, 1995).

Es común encontrar a las levaduras formando parte de la microbiota de alimentos fermentados a base de maíz como el kenkey, el mawe y el ogi (Hounhouigan *et al.*, 1994; Jespersen *et al.*, 1994; Ijabadeniyi, 2007), en este caso también se observó la presencia de levaduras y aunque al inicio de la fermentación eran el grupo que se encontraba en menor concentración, a las 24 h de fermentación sus cuentas ya habían aumentado 2.6 ciclos logarítmicos continuando su crecimiento hasta el cuarto día de fermentación alcanzando una concentración de 1.2×10^8 ufc/g, la cual disminuyó a 3.3×10^6 ufc/g al sexto día de fermentación, finalizando en una concentración similar a la de mesófilos aerobios no lácticos y bacterias lácticas amilolíticas.

En diferentes alimentos fermentados a base de cereales se ha reportado que estos microorganismos contribuyen de manera importante en el aroma de los productos (Halm *et al.*, 1996; Teniola & Odunfa, 2001; Annan *et al.*, 2003). En este caso, debido a que tanto la masa de nixtamal como las cajas Petri con agar papa dextrosa, en las que se siguió la cuenta de levaduras, presentaron aromas afrutados al cuarto día de fermentación, las levaduras podrían jugar un papel importante en la

aceptabilidad del pozol proporcionando aromas afrutados. La producción de aromas afrutados por levaduras aisladas del pozol se ha reportado en estudios realizados por Ampe *et al.*, (1999).

Por otro lado, es posible que durante la fermentación haya ocurrido una asociación entre las levaduras y las bacterias lácticas, ya que las BAL son responsables de acidificar la masa creando de esta manera condiciones que favorecen el crecimiento de las levaduras por ello incluso después de que el pH disminuyó a valores de 4.8-4.6, ocasionando la disminución en las cuentas de los demás grupos microbianos, las levaduras continuaron creciendo, a su vez las levaduras podrían haber promovido el crecimiento de las BAL al producir metabolitos como CO₂, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido acético (Leroi & Pidoux, 1993; Hounhouigan *et al.*, 1999).

Al inicio de la fermentación los microorganismos mesófilos aerobios no lácticos estaban presentes en concentraciones de 9.8×10^8 ufc/g y alcanzaron una concentración máxima de 2.5×10^9 ufc/g a las 12 h, de forma similar a lo observado por Wachter (1995), después su concentración disminuyó hasta llegar a 9.0×10^6 ufc/g al sexto día de fermentación.

Las altas concentraciones iniciales de microorganismos mesófilos aerobios no lácticos observadas se deben a que tanto las enterobacterias como las levaduras se encontraban presentes en concentraciones considerables. Es posible que la disminución observada se deba al efecto mencionado anteriormente en las enterobacterias.

Aunque en estudios realizados por Wachter *et al.* (2000) se ha detectado la presencia de mohos en pozol en concentraciones iniciales de 10^2 - 10^3 ufc/g, en este caso se les detectó hasta las 24 h de fermentación y se mantuvieron en una concentración promedio de 2.5×10^6 ufc/g hasta el cuarto día de fermentación, después de lo cual ya no se les detectó (Tabla 2).

Debido a que las levaduras se encontraban inicialmente en concentraciones de 3.5×10^4 ufc/g y crecieron de forma acelerada durante las primeras 24 h de fermentación, es posible que se desarrollaran rápidamente en las placas con agar

papa dextrosa consumiendo los nutrientes y ocupando el espacio del medio de cultivo, impidiendo de esta manera el crecimiento de los mohos y por tanto su detección (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de mohos durante la fermentación de masa de nixtamal.

Tiempo (h)	log ufc/g*
24	6.00 ± 0.00 v.e
48	6.66 ± 0.26 v.e
96	6.44 ± 0.40 v.e

*Se presenta el promedio de tres réplicas con su desviación estándar. v.e: valor estimado.

El xilano es uno de los constituyentes de la hemicelulosa, contenida en la fibra del pericarpio y de las paredes celulares del endospermo (Doner *et al.*, 2001). Al perderse el pericarpio durante la nixtamalización de los granos de maíz queda como fuente de xilano la fracción de fibra del endospermo que representa el 2.7% de éste (FAO, 1993). A diferencia de otros alimentos fermentados de maíz, la nixtamalización hace disponible a la hemicelulosa y nuestro grupo ha encontrado que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, que predomina dentro de las bacterias lácticas del pozol, tiene actividad xilanólítica (tesis de doctorado Cooper-Bribiesca, en proceso).

En la Figura 8 se puede observar que en la masa hubo una concentración considerable de microorganismos con actividad xilanólítica que se mantuvo entre 3.5×10^8 y 1.1×10^8 ufc/g durante los 6 días de fermentación.

En la Tabla 3 se puede observar la variedad en las características coloniales de los microorganismos xilanolíticos, los cuales eran mayoritariamente bacterias con formas cocoides, bacilares y de cocobacilos, y en menor proporción levaduras. En las etapas iniciales de la fermentación se observaron bacterias xilanolíticas Gram (-), sin embargo a partir de las 12 h fueron remplazadas por las Gram (+).

Debido a la concentración y variedad de microorganismos xilanolíticos observados a lo largo de la fermentación, la masa podría ser un sustrato con potencial para la obtención de este tipo de microorganismos.

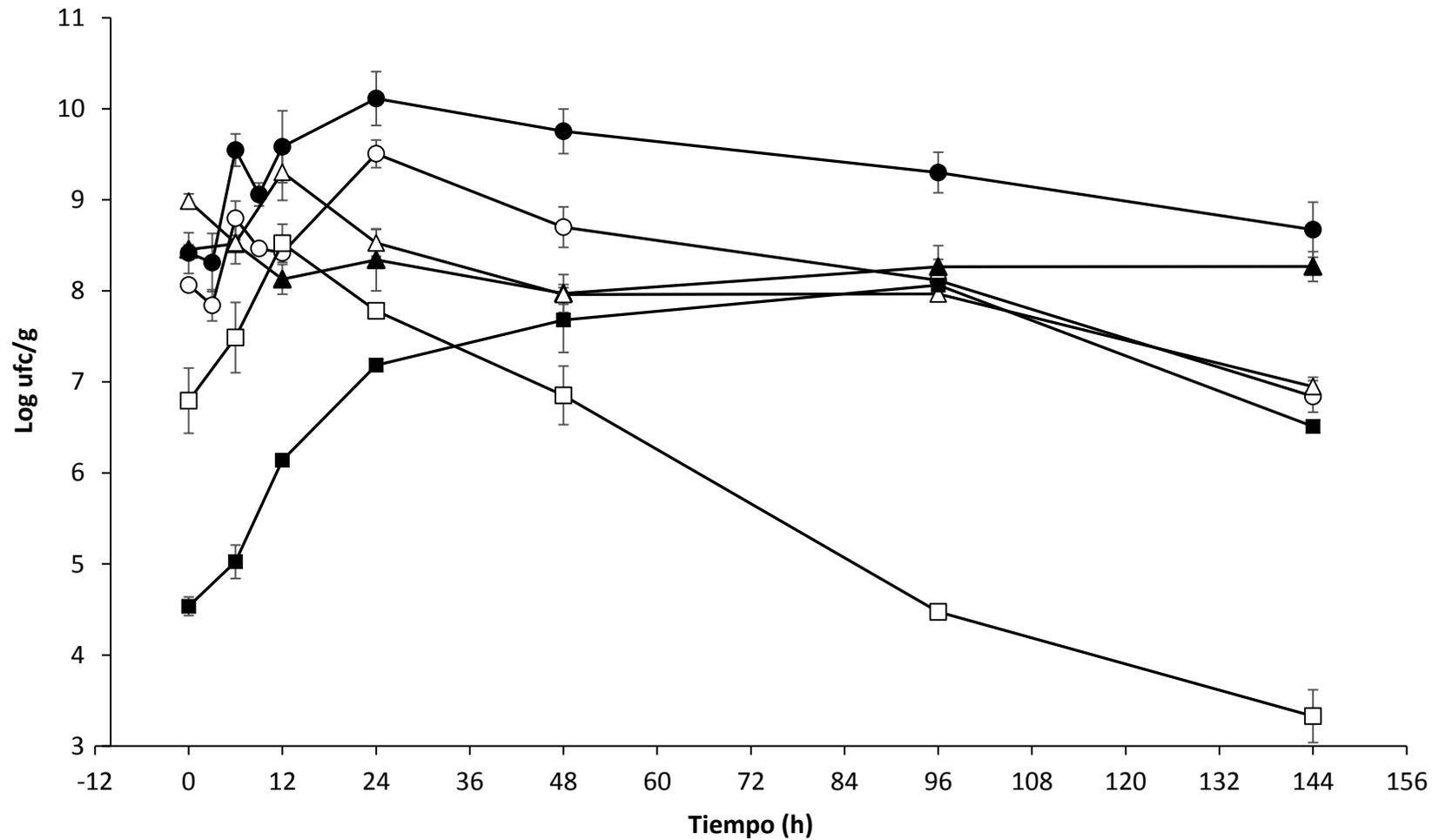


Figura 8. Crecimiento de bacterias lácticas (●), bacterias lácticas amilolíticas (○), xilanolíticos (▲), mesófilos aerobios no lácticos (Δ), enterobacterias (□) y levaduras (■) durante la fermentación natural de masa de nixtamal a 30 °C. Se presentan los valores promedio de tres réplicas con su desviación estándar como líneas verticales en los símbolos.

Tabla 3. Observación colonial y microscópica de microorganismos xilanolíticos presentes durante la fermentación.

OBSERVACIÓN COLONIAL	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA
Tiempo 0 h	
Colonias medianas, circulares, convexas y planas, de color anaranjado y rosa tenue	Bacilos G (-)
Colonias medianas, circulares, planas y convexas, de colores rosa y anaranjado tenue	Levaduras circulares y ovoides
Tiempo 6 h	
Colonia circular, plana, color rosa tenue y brillante	Bacilos G (-)
Colonias medianas, circulares, convexas, con brillo, de color anaranjado y crema	Cocos pequeños G (-)
Tiempo 12 h	
Colonias circulares, convexas, brillantes, de color melón y amarillo pálido	Cocobacilos G (-)
Colonia grande, circular, plana, brillante y de color blanco	Mezcla de cocos y cocobacilos G (+)
Colonia mediana, circular, convexa, brillante y de color anaranjado	Cocos agrupados en racimos G (+)
Colonias pequeñas y medianas, circulares, convexas, brillantes y de color blanco	Cocos pequeños G (+)
Colonia grande, circular, convexa, brillante y de color anaranjado tenue	
Tiempo 24-48 h	
Colonia pequeña, circular, convexa, brillante y blanca	Cocos agrupados en racimos G (+)
Colonia mediana, de bordes ondulados, plana y blanca	Cocos G (+)
Colonia pequeña, circular, convexa, blanca y brillante	
Colonia grande, circular, plana, brillante y color amarillo	Bacilos largos G (+)
Colonia grande, de bordes ondulados, plana, brillante y blanca	Bacilos cortos G (+)
Colonia mediana, circular, convexa, brillante y color crema	Mezcla de bacilos y cocobacilos G (+)
Colonia pequeña, circular con elevación en el centro y blanca	Cocos G (+)
Tiempo 96 h	
Colonia pequeña, circular con elevación en el centro, brillante y color crema tenue	Cocos agrupados en racimos G (+)
Colonia mediana, circular, convexa, brillante y color café oscuro	
Colonias pequeñas, circulares, brillantes y de color blanco y crema	Cocos G (+)
Colonia pequeña, circular, convexa, brillante y color amarillo tenue	Mezcla de bacilos en cadena G (+) con cocobacilos G (+)
Colonias medianas, circulares, convexas, brillantes y blancas	Levaduras circulares
Colonia mediana, circular, plana, textura cremosa, opaca y blanca	Levaduras ovoides y circulares
Tiempo 144 h	
Colonias pequeñas, circulares, convexas, brillantes y de color blanco y amarillo tenue	Cocobacilos G (+)
Colonia pequeña, circular, convexa, brillante y de color blanco	Bacilos cortos G (+)
Colonia grande, circular, convexa, textura cremosa, y color blanco	Levaduras circulares y ovoides

6.1.2 Cambios en las características de masa de nixtamal

❖ Cambios de pH y acidez

Debido al proceso térmico alcalino aplicado a los granos de maíz, la molienda de éstos resulta en una masa con valores de pH de 7.0 a 7.5 (Nuraida *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2003). Al iniciar la fermentación, la masa tenía un pH de 6.6 que es menor al descrito anteriormente. Esto se debe posiblemente a que durante el tiempo que transcurrió antes de incubar la masa a 30 °C, a partir de lo cual se consideró formalmente el inicio de la fermentación, la microbiota presente metabolizó parte de los azúcares produciendo ácidos orgánicos, ocasionando que el pH descendiera a 6.6.

En estudios realizados por Ampe *et al.* (1999) se encontró lactato como producto mayoritario de la fermentación de masas de nixtamal, por ello se expresó la acidez en términos de ácido láctico.

Durante las primeras 3 h de fermentación el pH se mantuvo constante y no se observó un incremento considerable de acidez, a las 6 h fue cuando se presentó una caída pronunciada de pH debido a que la acidez se triplicó. De las 6 a 12 h de fermentación la acidez se mantuvo en 0.3% y el pH sólo disminuyó 0.5 unidades llegando a 4.8. Este comportamiento se puede deber a que durante esta etapa se observó una disminución en las cuentas de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas por lo que es posible que no hubiera una producción importante de ácido láctico. Después de las 12 h la acidez continuó incrementando, alcanzando un valor de 1.5% a los seis días de fermentación.

El pH siguió disminuyendo alcanzando un valor de 3.6 al cuarto día de fermentación, por lo tanto se esperaría que a partir de este tiempo el ácido láctico estuviera mayoritariamente en su forma no disociada, que es la forma responsable del efecto antimicrobiano (Michael *et al.*, 2005), ya que el pH alcanzado a partir de este tiempo es menor que el valor pka del ácido láctico, 3.9. Al sexto día de fermentación se alcanzó un pH de 3.4, se han alcanzado valores de pH similares en masas fermentadas durante cinco días (Ampe *et al.*, 1999).

En alimentos fermentados a base de cereales se ha observado que la caída de pH ocurre de manera más rápida cuando la fermentación se realiza utilizando a ciertas bacterias lácticas como cultivos iniciadores provocando una rápida inactivación de bacterias entéricas incluso hasta niveles no detectables, en comparación con la fermentación natural de los mismos en la que el pH disminuye de manera más lenta y permite que las bacterias entéricas presentes se desarrollen (Masha *et al.*, 1998; Hernández, 2017). Es posible que en este caso, al ser una fermentación natural, la acidificación de la masa no haya ocurrido lo suficientemente rápido para que se diera una rápida inactivación de las bacterias entéricas y por ello estuvieron presentes aún después de 6 días de fermentación.

La disminución de pH observada se debe principalmente a la producción de ácido láctico por bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y en menor medida a la producción de ácido acético por parte de las bacterias lácticas heterofermentativas pues se ha detectado la formación de estos dos ácidos durante la fermentación de masa de nixtamal (Loeza, 1991; Ampe *et al.*, 1999).

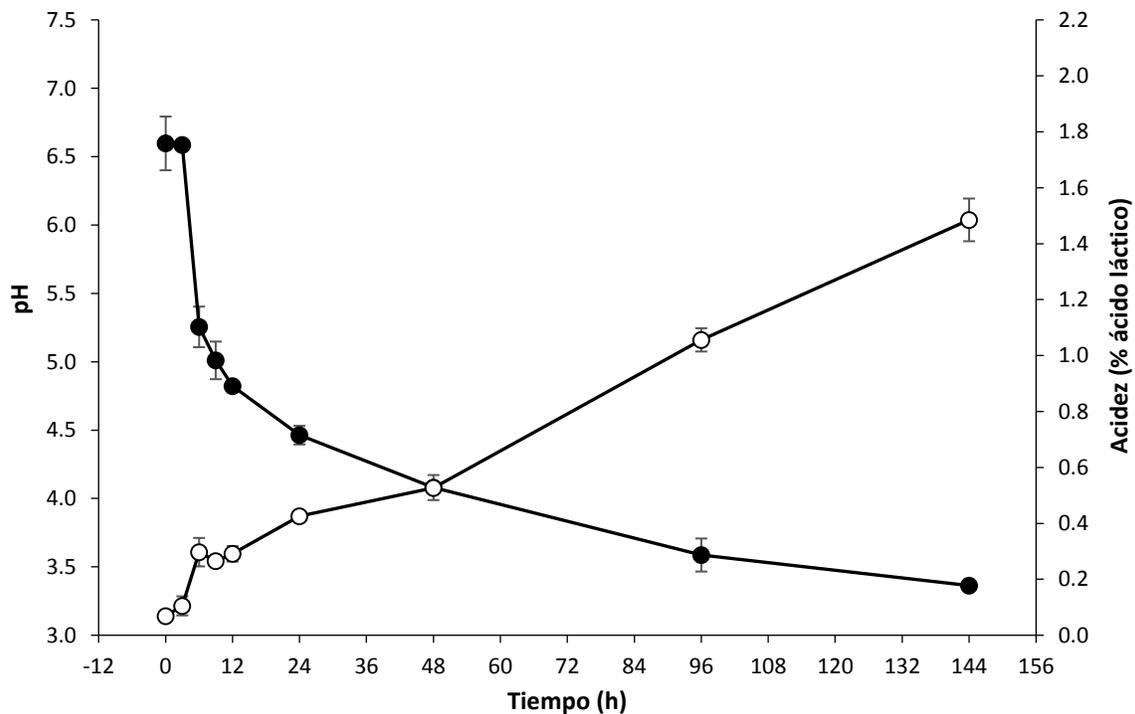


Figura 9. Cambios de pH (●) y acidez (○) durante la fermentación natural de masa de nixtamal a 30 °C. Se presentan los valores promedio de tres réplicas con su desviación estándar como líneas verticales en los símbolos.

❖ Cambios de humedad

Se han documentado valores de humedad de 51.8% en masas de nixtamal de productores indígenas y de 72.3% en masas de nixtamal de productores mestizos debido a que en estas últimas se realiza una cocción adicional de los granos de maíz después de la etapa de lavado que ocasiona una mayor absorción de agua (Wacher *et al.*, 2000).

En este caso se observaron valores de humedad similares a los de masas de nixtamal de productores indígenas.

En estudios realizados por Loaeza (1991) se observó una disminución de humedad en las masas de nixtamal conforme transcurría la fermentación debido a que después de cubrir las bolas de masa con envoltura plástica se hicieron varias perforaciones sobre la superficie de ésta permitiendo así la pérdida de humedad. En este caso se presentó el comportamiento opuesto, en la Tabla 4 se observa que la humedad aumentó ligeramente conforme transcurrió la fermentación lo cual podría deberse a que se libera agua cuando las bacterias lácticas metabolizan la glucosa en ácido láctico y a partir de la metabolización de azúcares vía oxidativa, por las levaduras, transformándolos en H₂O y CO₂ (Carballo, 2012), ya que en la parte superior de los vasos de vidrio en los que se realizó la fermentación quedó contenido aire antes de taponarlos, esta agua podría haber sido retenida por exopolisacáridos puesto que se han observado cepas productoras de exopolisacáridos del género *Leuconostoc* en pozol (Ampe *et al.*, 1999) además al taponar los frascos de vidrio con papel aluminio se evitó que las muestras se deshidrataran.

Tabla 4. Cambios de humedad de masa de nixtamal durante su fermentación natural a 30 °C.

Tiempo (días)	% Humedad*
0	51.81 ± 0.71
4	53.00 ± 1.26
6	56.80 ± 0.98

*Se presenta el promedio de tres réplicas con su desviación estándar.

6.1.3 Cambios en la concentración de CST y CR por efecto de la fermentación

Entre los carbohidratos reductores que se han detectado en la masa de nixtamal se encuentran la glucosa y la maltosa (Ampe *et al.*, 1999). Entre los carbohidratos solubles totales cuantificados a lo largo de la fermentación podrían estar además de los reductores, sacarosa, maltooligosacáridos y almidón.

La concentración de azúcares en el maíz disminuye de 2 g/100 g de grano en base seca a 0.1-0.7 g/100 g de masa en base seca después de la cocción alcalina, el remojo y el lavado de los granos de maíz para producir el nixtamal (Díaz *et al.*, 2003), por lo tanto el almidón representa una fuente importante de carbono para la fermentación (Ben Omar & Ampe, 2000), sin embargo no todas las bacterias lácticas son capaces de hidrolizar el almidón y sólo ciertas levaduras lo hidrolizan (Nuraida *et al.*, 1995), ejemplos de bacterias lácticas amilolíticas presentes durante la fermentación de masas de nixtamal son *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz *et al.*, 2003). Es posible que las fluctuaciones en la concentración de carbohidratos reductores (CR) y de carbohidratos solubles totales (CST) observadas durante la fermentación se deban a estas diferencias en la utilización de carbohidratos y a las diferencias observadas en el desarrollo de los diferentes grupos microbianos presentes durante la fermentación de masa de nixtamal.

Durante las primeras 3 h de fermentación los carbohidratos reductores se mantuvieron en una concentración de 3.8 mg de glucosa/g de masa; sin embargo, la concentración de carbohidratos solubles totales se duplicó, posiblemente esto se deba a una hidrólisis del almidón presente en la masa de nixtamal, ya que como se observó al inicio de la fermentación las BAAL se encontraban en concentraciones altas, 10^8 ufc/g; en estudios anteriores se ha visto que ciertas BAL aisladas del pozol tienen actividad xilanolítica, tales como *Streptococcus infantarius* (Cooper-Bribiesca *et al.*, 2013), *Lactococcus lactis* var. *lactis*, *Leuconostoc argenteum*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* (Flores,

2007) y también pudieron haber contribuido con el aumento en la concentración de CST observado, y esta puede ser la razón por la cual se incrementa la concentración de azúcares fermentables que abastecería la demanda de los diferentes grupos microbianos observados.

Las bajas concentraciones de carbohidratos reductores encontradas inicialmente en la masa de nixtamal concuerdan con lo reportado por Santillana (1995).

El pequeño incremento en la concentración de CST observado de las 3 a 6 h de fermentación sugiere que durante este tiempo hubo poca hidrólisis de almidón, obteniéndose principalmente azúcares reductores, pues la concentración de éstos aumentó. Es posible que después de esta etapa los CST se hayan utilizado para la fermentación, ya que su concentración disminuyó a las 9 h.

En la Figura 10 se puede observar que de las 12 a 24 h la concentración de carbohidratos reductores disminuyó de manera importante quizá porque durante este intervalo de tiempo hubo una mayor demanda de este tipo de carbohidratos, ya que tanto las BAL como las BAAL alcanzaron su cuenta máxima a las 24 h de fermentación y durante este tiempo se presentó un crecimiento importante de levaduras.

De las 24 a 48 h la concentración de CR prácticamente se mantuvo constante y solo se observaron ligeros cambios de pH y acidez indicando que durante esta etapa hubo poca conversión de azúcares en ácido láctico. Por otro lado, es posible que la baja concentración de CR observada haya promovido la hidrólisis de almidón como una manera de incrementar la concentración de azúcares fermentables, generando oligosacáridos en una primera etapa e hidrolizándolos en azúcares de menor tamaño en una etapa siguiente, puesto que de las 24 a 48 h la concentración de CST aumentó de 164.8 a 213.9 mg/g y al cuarto día de fermentación disminuyó a 121.8 mg/g, en esta etapa de disminución de CST la concentración de CR aumentó de 5.3 a 8.2 mg/g, del segundo al cuarto día. A la vez que se producían CR parte de éstos eran consumidos acidificando el medio como observado en la Figura 9.

Al sexto día de fermentación la concentración de CST aumentó nuevamente finalizando en 184.9 mg/g mientras que la concentración de CR disminuyó ligeramente, sin embargo debido a que la acidez aumentó considerablemente es

posible que como parte de la generación de CST se hayan liberado azúcares que se metabolizaron en ácido láctico ocasionado que la concentración de CR no disminuyera tanto.

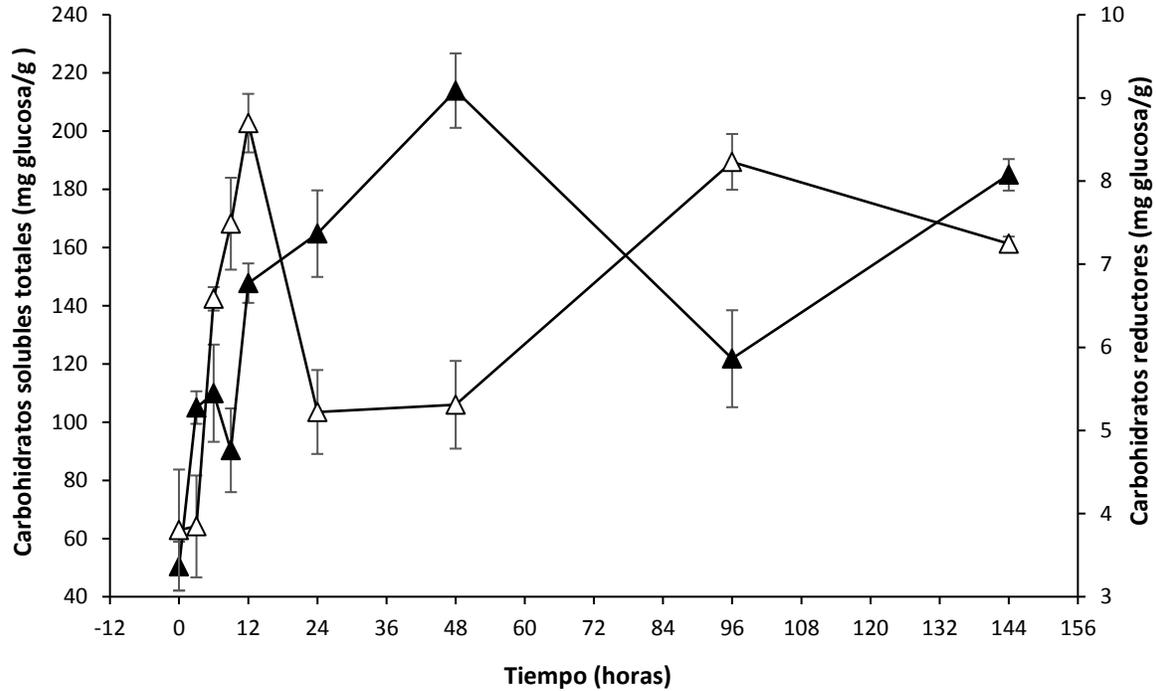


Figura 10. Cambios en la concentración de carbohidratos solubles totales (▲) y de carbohidratos reductores (Δ) durante la fermentación natural de masa de nixtamal a 30 °C. Se presentan los valores promedio de tres réplicas con su desviación estándar como líneas verticales en los símbolos.

6.2 Segunda fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado

El lote con el que se realizó la segunda fermentación tenía un pH de 7.32 ± 0.07 y una humedad de $52.57 \pm 0.89\%$.

6.2.1 Microbiota natural

En este caso al iniciar la fermentación los mesófilos aerobios no lácticos, las bacterias lácticas y las bacterias lácticas amilolíticas se encontraban en concentraciones de entre 10^6 y 10^7 ufc/g como se muestra en la Figura 11, ya que estas concentraciones son menores a las observadas en la primera fermentación es posible que en este caso la masa se haya conservado de mejor manera antes de su llegada al laboratorio, puesto que incluso su pH al llegar al laboratorio fue mayor que el observado en la masa de la primera fermentación.

Durante las primeras 6 h de fermentación tanto las bacterias lácticas como las bacterias lácticas amilolíticas tuvieron un crecimiento pronunciado y alcanzaron su concentración máxima a las 24 h como en la primera fermentación, en seguida entraron en fase estacionaria que se prolongó hasta las 48 h, después su cuenta disminuyó hasta llegar a 5.7×10^8 ufc/g en el caso de las bacterias lácticas y a 6.7×10^6 ufc/g en el caso de las bacterias lácticas amilolíticas al sexto día de fermentación (Figura 11). La presencia de bacterias lácticas en altas concentraciones observada a lo largo de la fermentación, en ambas fermentaciones, se corresponde con lo documentado por Nuraida *et al.* (1995), quienes describieron a la fermentación del pozol como una fermentación bacteriana ácido láctica.

En cuanto a los mesófilos aerobios no lácticos, se observó un aumento en sus cuentas a las 6 h de fermentación alcanzando 5.4×10^8 ufc/g, en la primera fermentación no se observó este comportamiento posiblemente porque la concentración reportada a las 6 h de fermentación fue un valor estimado debido a que las diluciones realizadas para su conteo no fueron suficientes, a partir de este tiempo y hasta a las 12 h se observó su fase estacionaria, en seguida inició la fase

de muerte en la que primero se observó una disminución de sus cuentas de aproximadamente un ciclo logarítmico a las 48 h y posteriormente un ligero aumento al cuarto día y después nuevamente disminuyó finalizando en 2.5×10^7 ufc/g al sexto día de fermentación (Figura 11).

A diferencia de la primera fermentación esta vez sí se observó una fase estacionaria en los tres grupos microbianos y se alcanzaron concentraciones máximas ligeramente menores, es razonable haber observado diferencias entre las dos fermentaciones, ya que se llevaron a cabo por la microbiota natural y por tanto no se tuvo un control sobre la concentración y proporción de los diferentes grupos microbianos, a pesar de ello de manera general las bacterias lácticas, las bacterias lácticas amilolíticas y los mesófilos aerobios no lácticos se comportaron de manera muy similar en ambas fermentaciones.

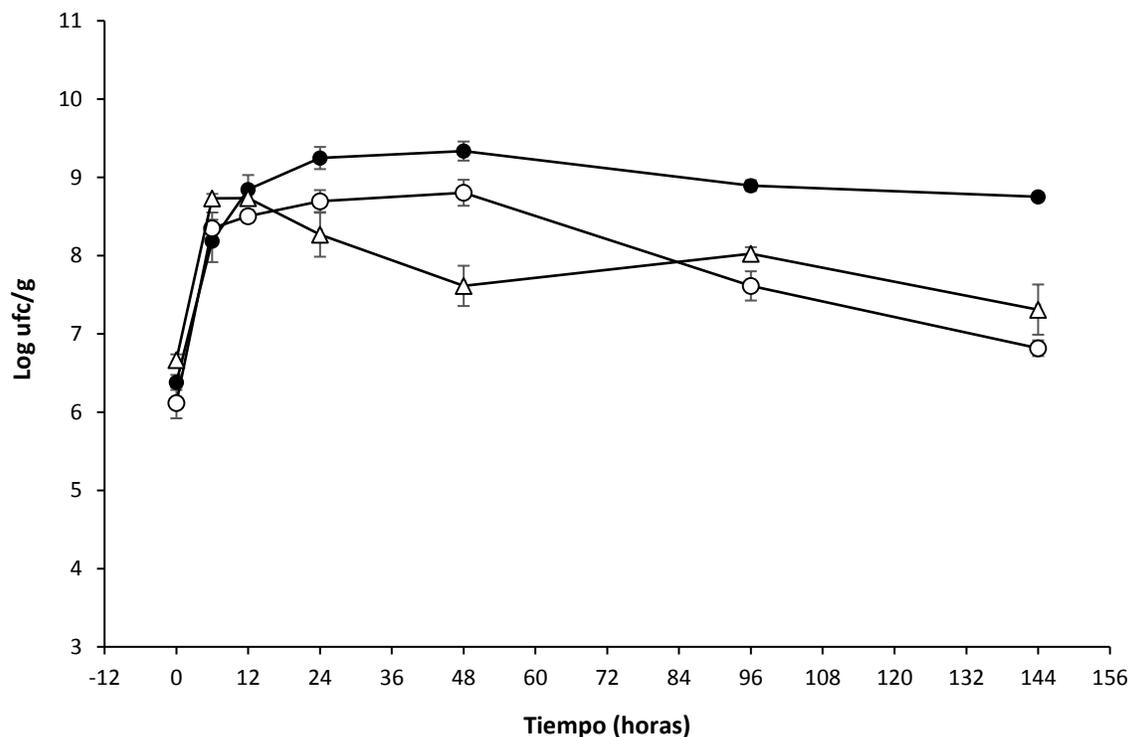


Figura 11. Crecimiento de bacterias lácticas (●), bacterias lácticas amilolíticas (○) y mesófilos aerobios no lácticos (Δ) durante la segunda fermentación natural de masa de nixtamal a 30 °C. Se presentan los valores promedio de tres réplicas con su desviación estándar como líneas verticales en los símbolos.

6.2.2 Cambios en las características de masa de nixtamal

❖ Cambios de pH y acidez

En este caso al iniciar la fermentación la masa tenía un pH de 7.4 y durante las primeras 12 h de fermentación cayó pronunciadamente llegando a un valor de 5.2 y continuó disminuyendo hasta llegar a 3.6 al cuarto día de fermentación manteniéndose constante hasta el sexto día de fermentación.

A pesar de que en este caso la fermentación de masa de nixtamal inició con pH mayor al observado en la primera fermentación conforme transcurrió la fermentación tendió a llegar a los valores de pH observados en la primera fermentación, tal como se muestra en la Figura 12.

En cuanto a la acidez también se obtuvieron valores iniciales menores que en la primera fermentación correspondiéndose con lo observado en las cuentas de los grupos microbianos y el pH (Figura 12).

En este caso el aumento en la acidez ocurrió más lentamente en la etapa inicial de la fermentación, ya que durante las primeras 12 h ésta sólo aumentó de 0.04 a 0.16%, sin embargo a las 24 h se llegó a la misma acidez en ambas fermentaciones y después de este tiempo la acidificación de la masa ocurrió a una mayor velocidad, finalizando en 1.84% en esta segunda fermentación que es mayor al obtenido en la primera fermentación a pesar de que en ambas fermentaciones se llegó a los mismos valores de pH.

De manera general en las dos fermentaciones se observó el mismo patrón de acidificación.

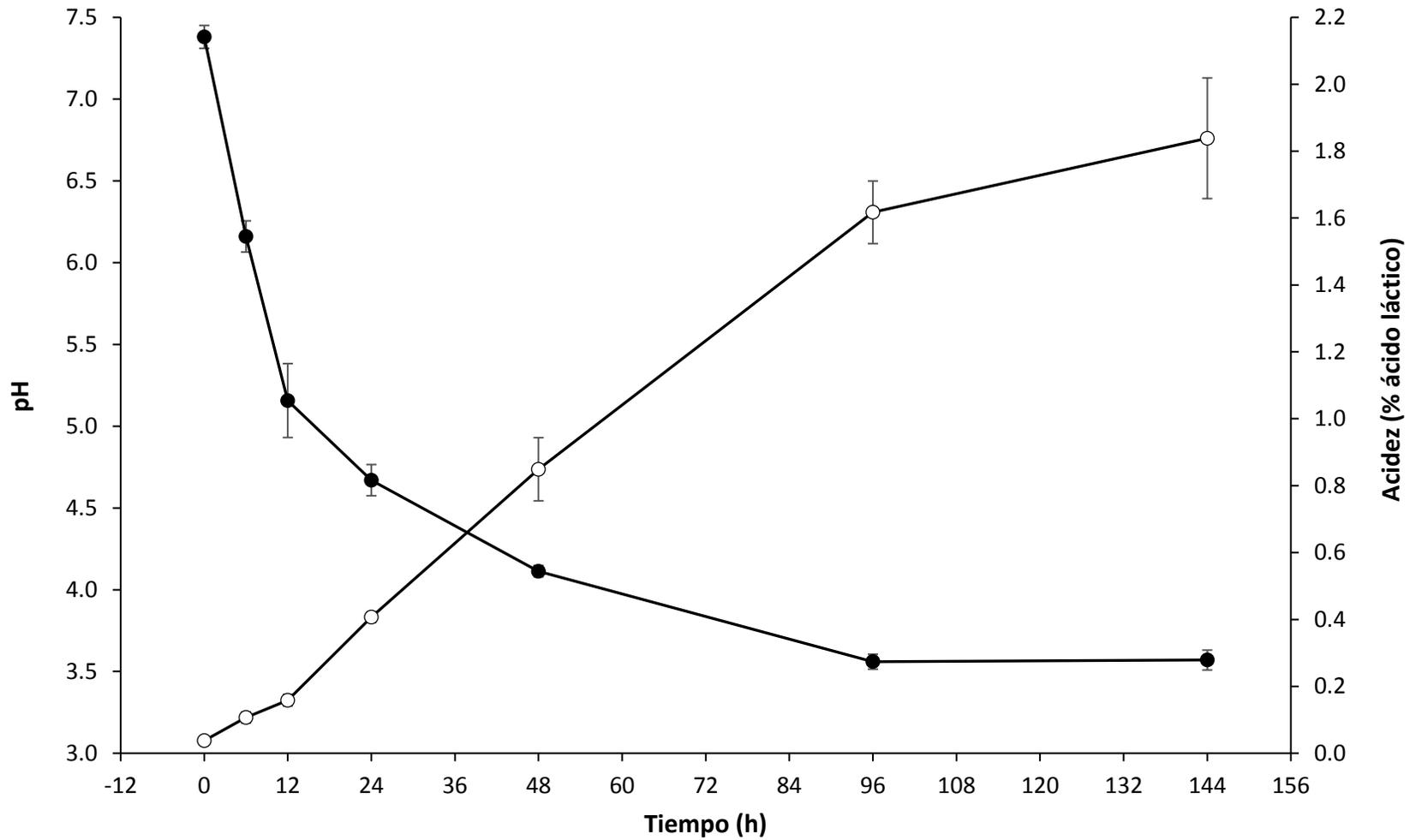


Figura 12. Cambios de pH (●) y acidez (○) durante la segunda fermentación natural de masa de nixtamal a 30 °C. Se presentan los valores promedio de tres réplicas con su desviación estándar como líneas verticales en los símbolos.

❖ Cambios de humedad

La masa utilizada en esta fermentación tenía una humedad inicial de 52.57%, que es similar a la humedad inicial de la masa utilizada en la primera fermentación, las masas utilizadas en las dos fermentaciones se adquirieron con el mismo productor, por lo tanto, es posible que la etapa de cocción y la de remojo durante el proceso de nixtamalización de los granos para la elaboración de la masa se hayan estandarizado. ya que el contenido de agua de los granos aumenta en estas etapas (Rodríguez *et al.*, 2008) y esto permitiría obtener lotes de masa de nixtamal de humedad similar.

Después de un día de fermentación se registró una humedad menor a la observada al inicio de la fermentación, esto posiblemente se debe a la heterogeneidad de la matriz puesto que la fermentación se realizó en frascos de vidrio tapados con aluminio y asegurados con ligas, que evitaría pérdidas de humedad, en un estudio realizado anteriormente en el que la fermentación también se realizó como se describió anteriormente se observó que el contenido de humedad se mantuvo constante durante la fermentación (González & Jiménez, 2010).

En este caso la humedad también tendió a aumentar conforme transcurrió la fermentación como se muestra en la Tabla 5 aunque los aumentos fueron menores a los observados en la primera fermentación.

Tabla 5. Cambios de humedad de masa de nixtamal durante su fermentación natural a 30 °C.

Tiempo (días)	% Humedad*
0	52.57 ± 0.89
1	51.28 ± 0.25
2	53.46 ± 0.22
4	54.66 ± 0.34
6	54.26 ± 0.78

*Se presenta el promedio de tres réplicas con su desviación estándar.

6.3 Transiciones observadas en masas de nixtamal fermentadas

Al inicio de la fermentación se observó una transición endotérmica en las masas de nixtamal que continuó apareciendo durante el transcurso de la fermentación como se muestra en la Figura 13.

Se piensa que estas transiciones observadas corresponden a la gelatinización de almidón, ya que se presentaron dentro del intervalo de temperatura en que se observó la transición endotérmica de una muestra de almidón ceroso de maíz (MC) la cual inició en 62.5 °C, terminó en 81.5 °C y cuya temperatura pico fue de 69.7 °C. Estos valores son similares a las temperaturas T_i , T_p y T_f de la gelatinización de almidón de granos de maíz reportadas por Santiago-Ramos *et al.* (2017).

El que se haya presentado esta transición incluso después de seis días de fermentación indica que durante el transcurso de la fermentación, en la masa de nixtamal siempre hubo almidón no gelatinizado posiblemente porque la demanda de carbohidratos fermentables para el desarrollo microbiano fue cubierta principalmente por los azúcares libres presentes al inicio de la fermentación y por azúcares proporcionados por los microorganismos amilolíticos a partir de la hidrólisis del almidón que se gelatinizó durante el proceso de nixtamalización, ya que para las amilasas es más difícil actuar sobre el almidón en estado granular que sobre el gelatinizado (Uthumporn *et al.*, 2010).

Comportamiento de la T_i , T_p y T_f durante la fermentación

Por otro lado, en la Tabla 6 se puede notar que a las 24 h de fermentación la temperatura inicial de la transición observada aumentó 1.82%, la temperatura pico aumentó 1.68% y la temperatura final aumentó 1.19%. Los valores obtenidos en los siguientes tiempos de fermentación fueron muy similares a los observados a las 24 h. Es posible que estos aumentos estén relacionados con los cambios observados en la concentración de carbohidratos solubles totales, ya que durante las primeras 24 h de fermentación tuvieron un incremento total de 114.28 mg glucosa/g de masa, siendo el incremento más notorio, y durante el transcurso de la fermentación la concentración de éstos siempre fue mayor a la detectada al inicio de la fermentación.

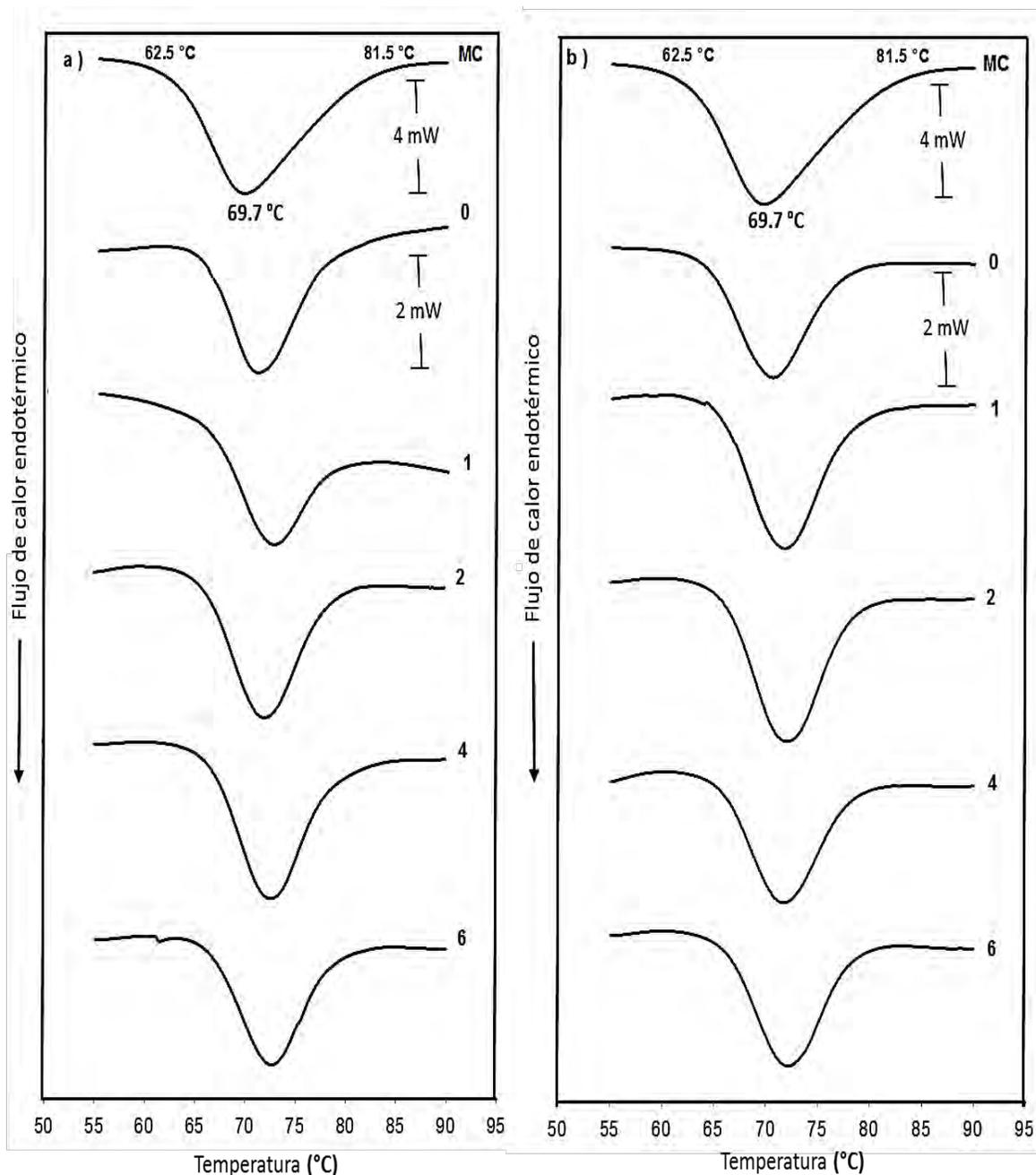


Figura 13. Transiciones observadas en masas de nixtamal fermentadas a 30 °C de la réplica 1 (a) y 2 (b) y en una muestra de almidón ceroso de maíz (MC). Los números a la derecha de las endotermas indican el tiempo de fermentación en días, y los valores 62.5, 69.7 y 81.5 °C en la muestra MC indican el inicio, la temperatura pico y el término de la transición, respectivamente. El endoterma mostrado para MC fue proporcionado por el Laboratorio 313 del Departamento de Alimentos y Biotecnología (Facultad de Química, UNAM).

Este comportamiento concuerda con lo observado en estudios realizados sobre la influencia que tienen azúcares tales como fructosa, glucosa, sacarosa, trehalosa en el proceso de gelatinización de almidón, en los que se ha encontrado que la temperatura de gelatinización aumenta cuando la concentración de estos azúcares incrementa en las soluciones utilizadas para la elaboración de las suspensiones de almidón (Perry & Donald, 2002; Jurislav *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2015). De acuerdo con BeMiller & Whistler (2009), el comportamiento antes descrito podría ser el resultado conjunto de los siguientes eventos: reducción de la cantidad de agua disponible para el almidón por la presencia de solutos, interacciones de los múltiples grupos hidroxilo contenidos en la estructura de los azúcares con las cadenas del almidón estabilizando las regiones amorfas del gránulo, obstaculizando de esta forma el hinchamiento del gránulo que se da por la absorción de agua y por tanto aumentando la temperatura para que ocurra la gelatinización.

Sin embargo, los cambios observados en las temperaturas inicial, pico y final de la transición con el tiempo de fermentación, no fueron estadísticamente significativos de acuerdo con el análisis de varianza realizado (Tablas F, G y H en Anexos).

Entalpía de transición

La entalpía de la transición se mantuvo entre 2.63 y 3.00 J/g masa durante los 6 días de fermentación como se puede ver en la Tabla 6. Estos valores son inferiores a los reportados en la literatura para la gelatinización de almidón de maíz nativo (Coral *et al.*, 2009; Schirmer *et al.*, 2013) pero están en el orden de los determinados en harinas de nixtamal (Coral, 2010). Esto se puede deber a que ocurre una gelatinización parcial del almidón durante el proceso termoalcalino al que se someten los granos de maíz antes de formar la masa, provocando una disminución en la entalpía de gelatinización como lo documentan Santiago-Ramos *et al.* (2017). De acuerdo con el análisis de varianza realizado, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la entalpía con el tiempo de fermentación (Tabla K en Anexos).

Amplitud y simetría de la transición observada

La amplitud de las transiciones, expresada como ΔT , se ubicó entre 11.9 y 12.7 °C. Las diferencias de amplitud encontradas entre masas fermentadas a diferentes tiempos, de acuerdo con el análisis estadístico realizado (Tabla I y Tabla J en Anexos), se atribuyen a la heterogeneidad de las muestras, ya que la masa de nixtamal está constituida por polímeros de almidón mezclados con gránulos de almidón parcialmente gelatinizados, gránulos crudos, partes de endospermo y lípidos que forman una red compleja heterogénea dentro de una fase acuosa continua (Coral, 2010).

Por otro lado, los picos de las transiciones presentaron cierta simetría puesto que los valores de ΔT_1 , $T_p - T_i$, fueron muy similares a los de ΔT_2 , $T_f - T_p$, observándose una diferencia máxima de 0.8 °C entre ellos, en comparación con los valores de gelatinización de almidón de nixtamal reportados en la literatura, en los que se observan diferencias hasta de 8.6 °C entre ΔT_1 y ΔT_2 (Santiago-Ramos *et al.*, 2017). La diferencia entre ΔT_1 y ΔT_2 se puede deber a que los picos muestran la transición de una población de gránulos de almidón, los cuales posiblemente presentan diferencias en su estructura debido al proceso de nixtamalización; además hay que considerar que es probable que los gránulos de almidón no estuvieran distribuidos homogéneamente en la masa.

Tabla 6. Temperaturas y entalpías de las transiciones endotérmicas observadas en masas de nixtamal fermentadas a 30 °C.

Tiempo (días)	0	1	2	4	6
T_i (°C)	64.84 ± 0.71	66.02 ± 0.53	66.08 ± 0.05	66.14 ± 0.56	66.44 ± 0.33
T_p (°C)	70.82 ± 0.35	72.01 ± 0.52	72.04 ± 0.07	72.17 ± 0.58	72.37 ± 0.36
T_f (°C)	77.55 ± 0.56	78.47 ± 0.52	78.35 ± 0.06	78.52 ± 0.40	78.33 ± 0.26
ΔT (°C)	12.71 ^a ± 0.15	12.45 ^a ± 0.01	12.27 ^{ab} ± 0.11	12.38 ^a ± 0.16	11.89 ^b ± 0.07
ΔT₁ (°C)	5.98 ± 0.37	6.00 ± 0.00	5.95 ± 0.13	6.03 ± 0.02	5.93 ± 0.03
ΔT₂ (°C)	6.73 ± 0.22	6.45 ± 0.01	6.31 ± 0.02	6.35 ± 0.18	5.96 ± 0.10
ΔH (J/g)	2.63 ± 0.23	3.00 ± 0.21	2.80 ± 0.00	2.90 ± 0.17	2.65 ± 0.00

Se muestra el promedio de dos réplicas con su desviación estándar. Donde $\Delta T_1 = T_p - T_i$ y $\Delta T_2 = T_f - T_p$. Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

7. CONCLUSIONES

Las BAL junto con las BAAL parecen ser las más aptas para la fermentación de masa de nixtamal, ya que tendieron a predominar en cuanto a concentración sobre los demás grupos microbianos durante el tiempo de fermentación estudiado.

Las levaduras, a pesar de encontrarse inicialmente en bajas concentraciones, también mostraron un buen desarrollo durante el transcurso de la fermentación, mientras que a los mohos sólo se les detectó en el intervalo de tiempo de 24 a 96 h.

Durante los 6 días de fermentación los microorganismos xilanolíticos se mantuvieron en concentraciones de entre 3.5×10^8 y 1.1×10^8 ufc/g. Dentro de este grupo se observaron bacterias con morfologías bacilares, cocoides y cocobacilares, y levaduras circulares y ovoides.

Las enterobacterias crecieron durante las primeras 12 horas de fermentación y en seguida entraron en fase de muerte, sin embargo no se eliminaron por completo.

Los microorganismos mesófilos aerobios no lácticos y las levaduras se comportaron como se ha reportado en este alimento.

Las características fisicoquímicas de las masas de nixtamal se modificaron durante su fermentación, su humedad tendió a aumentar y su pH descendió alcanzando valores que se han reportado en masas fermentadas para pozol.

Se observaron aumentos en la concentración de CST y CR en la etapa inicial de fermentación sugiriendo que se hidrolizó almidón y xilano, las disminuciones posteriores en su concentración posiblemente se deben a que se consumieron.

A partir del análisis térmico de las masas de nixtamal con el uso de la técnica μ DSC se observaron transiciones endotérmicas que se atribuyen a la gelatinización de almidón, cuyas características no sufrieron cambios significativos con el tiempo de fermentación.

8. PERSPECTIVAS

Para tener mayor certeza de que las transiciones observadas se deben a la gelatinización de almidón presente en la masa, se propone el uso de la técnica de difracción de rayos X con la que se puede observar un patrón de difracción de rayos X similar al de la Figura 14 que es característico del almidón de maíz. Así mismo se propone emplear microscopía electrónica de barrido que permite observar la presencia de los gránulos de almidón y un estudio más profundo sobre las características de éstos y al mismo tiempo saber si se modifican a lo largo de la fermentación.

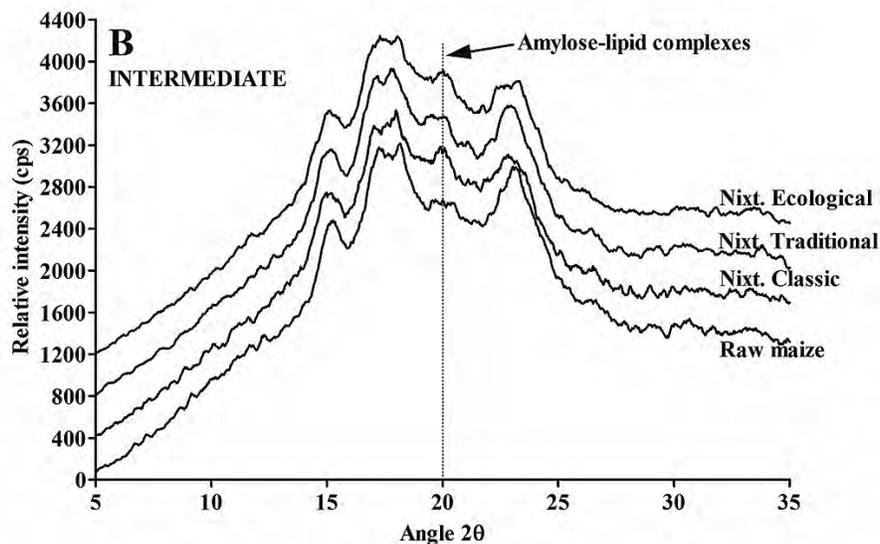


Figura 14. Patrones de difracción de rayos X de almidón de maíz crudo y almidón de nixtamal (de granos de dureza intermedia), obtenidos de tres procesos de nixtamalización diferentes (Santiago-Ramos *et al.*, 2017).

9. REFERENCIAS

- Adebayo, C. O., Aderiyé, B. & Akpor, O. B. (2013). Occurrence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria during the fermentation of cassava mash, maize and sorghum grains. *Microbiology Research International*, 1(2), 27-32.
- Ampe, F., Omar, N. B., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-5473.
- Annan, N. T., Poll, L., Sefa-Dedeh, S., Plahar, W. A., & Jakobsen, M. (2003). Influence of starter culture combinations of *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* on aroma in Ghanaian maize dough fermentation. *European Food Research and Technology*, 216, 377-384.
- Arendt, E. & Zannini, E. (2013). *Cereal grains for the food and beverage industries*. Oxford: Woodhead Publishing.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. 4a edición. México: Pearson Educación.
- Barnard, H., Dooley, A. K., Areshian, G., Gasparyan, B., Faull, K. F. (2010). Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science*, xxx, 1-8.
- BeMiller, J. & Whistler, R. (Ed). (2009). *Starch. Chemistry and Technology*. 3th Edition. London: Academic Press.
- Ben Omar, N. & Ampe, F. (2000). Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3664-3673.
- Bhanwar, S. & Ganguli, A. (2014). α -amylase and β -galactosidase production on Potato starch waste by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from pickled yam. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 73, 324-330.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543.

- Brandt, M. J. (2014). Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiology*, 37, 41-43.
- Carballo, J. (2012). The role of Fermentation Reactions in the Generation of Flavor and Aroma of Foods. En Mehta, B.M., Kamal-Eldin, A. & Iwanski, R. Z. (Ed), *Fermentation: effects on food properties* (51-87). Boca Raton: CRC Press.
- Chen, J. & Zhu, Y. (2014). *Solid State Fermentation for Foods and Beverages*. Boca Raton: CRC Press.
- Cooper-Bribiesca, B. L., Díaz-Ruiz, G., Navarro-Ocaña, A. & Wachter, C. (Junio, 2013). *Streptococcus infantarius isolated from pozol shows xylanase activity*. Documento presentado en XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, México.
- Cooper-Bribiesca, B. L. (2017). Hemicelulosa como sustrato para la fermentación láctica del nixtamal. (Tesis de doctorado). Ciencias bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. En proceso.
- Coral, D. F., Pineda-Gómez, P., Rosales-Rivera, A. & Rodríguez-García, M. E. (2009). Determination of the gelatinization temperature of starch presented in maize flours. *Journal of Physics: Conference, Series* 167.
- Coral, D. F. (2010). *Influencia del hidróxido de calcio en las propiedades físico químicas del almidón de maíz*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Corsetti, A., Perpetuini, G. & Tofalo, R. (2015). Biopreservation effects in fermented foods. En W. Holzapfel. (Ed), *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits* (pp. 311-332. Cambridge, U. K: Woodhead Publishing
- Delwen, S. (1996). (a). Archaeology of Ancient Egyptian Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(1), 3-12.
- Delwen, S. (1996). (b). Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science*, 273, 488.
- Díaz, G. (2003). *Fermentación del almidón, por bacterias lácticas amilolíticas aisaldas del pozol*. (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamentos de Alimentos y Biotecnología.

- Díaz, G., Guyot, J. P., Ruíz, F., Morlon, J. & 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 and Environmental Microbiology*, 69(8), 4367-4374.
- Dominguez-Ramírez, L. L. (2017). *Comportamiento de cepas de Streptococcus aisladas del pozol ante la temperatura alta y el pH bajo presentes durante la elaboración de la masa y durante su fermentación*. (Tesis de doctorado). Ciencias bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. En proceso.
- Doner, L. W., Johnston, D. B. & Singh, V. (2001). Analysis and Properties of Arabinoxylans from Discrete Corn Wet-Milling Fiber Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1266-1269.
- Eliasson, A. C. (2004). *Starch in food: structure, function and applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- FAO. (1993). Composición química y valor nutritivo del maíz. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm>.
- Fennema, R. *Química de los alimentos*. (1995). 2ª edición. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza.
- Flores, A. G. (2007). *Estudio de bacterias lácticas xilanolíticas aisladas del pozol. Identificación por medio de ARDRA*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- González, A. & Jiménez, A. E. (2010). *Cambios químicos y reológicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gosset, M. (2015). *Efecto de la temperatura de fermentación y la adición de xantana sobre las propiedades mecánicas y la estabilidad térmica de pan blanco durante su envejecimiento*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

- Guyot, J.P., Calderon, M. & Morlon-Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 176–182.
- Haard, N. F., Odunfa, S. A., Lee, C-H., Quintero, R., Lorence, A. & Wachter, C. (1999). *Fermented Cereals. A global perspective*. Rome: FAO. Agricultural Services Bulletin. 138.
- Halm, M., Osei-yaw, A., Hayford, A. E. & Amoa-Awua, W. K. A. (1996) Experiences with the use of a starter culture in the fermentation of maize for 'kenkey' production in Ghana. *World J. World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12, 531–536.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H. & Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1–3), 4–11.
- Hernández, J. V. (2017). *Producción de atole agrio usando Lactococcus lactis (A1MS3) y Pediococcus pentosaceus (Sol10) como inóculo*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamentos de Alimentos y Biotecnología.
- Herrera, T. (2003). Impresiones de un breve recorrido de la memoria a través de más de medio siglo en la UNAM. *Coordinación de la Investigación Científica. UNAM*.
- Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197-2012.
- Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H., Rombouts, F. M. (1994). Microbiological changes in mawè during natural fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(4), 410-413.
- Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H. & Rombouts, F. M. (1999) Use of starter cultures of lactobacilli and yeast in the fermentation of mawe, an African maize product. *Tropical Science*, 39, 220–226.

- Ijabadeniyi, A. O. (2007). Microorganisms Associated with Ogi Traditionally Produced from Three Varieties of Maize. *Research Journal of Microbiology*, 2: 247-253.
- James, M. J. (1982). Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532.
- Jespersen, L., Halm, M., Kpodo, K. & Jakobsen, M. (1994). Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for 'kenkey' production. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2), 239-248.
- Jiménez, J. C. (2012). *Maize: Cultivation, Uses and Health Benefits*. Hauppauge: Nova Science Publishers.
- Jiménez, V., González, N., Magaña, A. & Corona, A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 070-080.
- Jurislav, B., Drago, Š., Bronislav, M., Durdica, A., Mírela, K. & Nela, N.T. (2009). Influence of trehalose, Glucose, Fructose, and Sucrose on gelatinisation and retrogradation of corn and tapioca starches. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(3), 151-157.
- Johansson, M-L., Sanni, A., Likner, C. & Molin, G. (1995). Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 159-168.
- Kalui, C.M., Mathara, J.M. & Kutima, P.M. (2010). Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – A review. *African Journal of Biotechnology*, 9(17), 2490-2498.
- Karovičová, J. & Kohajdová, Z. (2003). Lactic acid-fermented vegetable juices - Palatable and wholesome foods. *Chemical Papers*, 59(2), 143-148.
- Karovičová, J. & Kohajdová, Z. (2007). Fermentation of cereals for specific purpose. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46(2), 51-57.
- Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.

- Kumar, V., Sheoran, P., Gupta, A., Yadav, J., Kumar, S. (2016). Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Annals of Microbiology*, 66(4), 1431 –1440.
- Kumar, R. S., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. & Arul, V. (2012). Traditional Indian fermented foods: a rich source of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(4), 415-428
- Lago, N., Arias, I. G., Legido, J. L. & Vázquez, C. (2016). Microcalorimetría: un método de diagnóstico precoz de infecciones bacterianas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 82(1), 91-96.
- Leroi, F. & Pidoux, M. (1993). Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Microbiology*, 74(1), 54-60.
- 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.
- Lichtfouse, E. & Goyal, A. (Ed). (2015). *Sustainable agriculture reviews: cereals*. Cham: Springer.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C. & Maillard J. Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother*, 67(7), 1589-1596.
- Loaeza, N. A. (1991). *Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- López, C. M. (2005). *Efecto del pH y de la temperatura en el crecimiento de bacterias del género Streptococcus aisladas del pozol*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. 12a edición. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Masha, G. G. K., Ipsen, R., Petersen, M. A. & Jakobsen, M. (1998). Microbiological, rheological and aromatic characteristics of fermented Uji (an

- East African Sour Porridge). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 451-456.
- Mbugua, S. K., Njenga, J. (1991). The antimicrobial activity of fermented uji. *Ecology of Food and Nutrition*, 28(3), 191-198.
 - McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C-shan., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *PNAS*, 101(51), 17593–17598.
 - McNaughton, J. L. & Mortimer, C. T. (1975). *Calorimetria Diferencial de Barrido*. Connecticut: Perkin Elmer Corporation Norwalk. Serie 2. Volumen 10.
 - Méndez, G., Trejo, J. L., Paredes, O. y Bello, L. A. (2007). Physicochemical and morphological characteristics of nixtamalized maize starch. *Starch/Staerke*, 59(6), 277-283.
 - Mensah, P., Tomkins, A. M., Drasar, B. S. & Harrison, T. J. (1991). Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Applied Microbiology*, 70(3), 203-210.
 - Mensha, P. (1997). Fermentation-the key to food safety assurance in Africa? *Food control*, 8(5/6), 271-278.
 - Michael, P., Sofos, J. N. & Branen, A. L. (2005). *Antimicrobials in food*. 3^a edition. Boca Raton: CRC Press.
 - Moorthy, S. N., Andersson, L., Eliasson, AC., Santacruz, S. & Ruales, J. (2006). Determination of Amylose Content in Different Starches Using Modulated Differential Scanning Calorimetry. *Starch/Stärke*, 58, 209–214.
 - Nielsen, S. (2010). *Food Analysis*. Fourth Edition. New York: Springer.
 - Núñez, M., Sandoval, A. J., Müller, A. J., Della-Valle, G. & Lourdin, D. (2009). Thermal Characterization and Phase Behavior of a Ready-to-Eat Breakfast Cereal Formulation and its Starchy Components. *Food Biophysics*, 4, 291–303.
 - Nuraida, L., Owens, J.D. & Wachter, M.C. (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 567-571.

- Nyanzi, R. & Jooste, P.J. (2012). *Cereal-Based Functional Foods*. En Rigobelo, E. C. (Ed.), *Probiotics*. DOI: 10.5772/50120. Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/probiotics/cereal-based-functional-foods>.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I., Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.
- Ogunremi, O. R., Agrawal, R. & Sanni, A. I. (2015). Development of cereal-based functional food using cereal-mix substrate fermented with probiotic strain—*Pichia kudriavzevii* OG32. *Food Science & Nutrition*, 3(6), 486–494.
- Olympia, M., Fukuda, A., Ono, H., Kaneko, Y. & Takano, M. (1995). Characterization of Starch-Hydrolyzing Lactic Acid Bacteria Isolated from a Fermented Fish and Rice Food, “Burong Isda”, and Its Amylolytic Enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(2), 124-130.
- Omemu, A. M., Faniran, O. W. (2011). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize products - ogi and kunnu-zaki. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(3), 124-128.
- Pandey, A., Soccol, C. R. & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35 (10), 1153–1169.
- Perry, P. A. & Donald, A. M. (2002). The effect of sugars on the gelatinisation of starch. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 155–165.
- Petrova, P., Petrov, K. & Stoyancheva, G. (2013). Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria - Structures, properties, and applications. *Starch/Starke*, 65(1-2), 34-47.
- Poutanen, K., Flander, L. & Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26, 693–699.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 1–15.
- Ramírez, R. M., Luna, B., Velázquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Muggenburg, I., Camacho, A. y Urzúa, M. del C. (2008). *Manual*

- de Prácticas de Microbiología General*. 5a edición. D.F, México: Facultad de Química, UNAM.
- Ray, R.C. & Montet, D. (Ed). (2015). *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. Boca Raton: CRC Press.
 - Ray, R.C. & Montet, D. (2016). *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press.
 - Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. & Kumar E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology Advances*, 1, 22-34.
 - Rodríguez, M. E., Serna, S. O. y Sánchez, F. (2008). *Nixtamalización del maíz a la tortilla: aspectos nutrimentales y toxicológicos*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. Serie Ingeniería.
 - Romo, A. (1988). *Química, Universo, Tierra y Vida*. D.F, México: Fondo de cultura económica.
 - Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A. & Eslava, C. (2001). Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 53-62.
 - Sánchez, S., Moreno, E. & Valdivia, M. A. (2003). Study of denaturation of corn proteins during storage using differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 83, 531-540.
 - Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J. & Guyot, J. P. (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 53-62.
 - Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. D., Véles-Medina, J. J. & Mariscal-Moreno, R. M. (2017). Changes in the thermal and structural properties of maize starch during nixtamalization and tortilla-making processes as affected by grain hardness. *Journal of Cereal Science*, 74: 72-78.

- Santillana, M. R. (1995). Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol. (Tesis de maestría). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saquib, A. A. N. & Whitney, P.J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and disaccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748-4750.
- Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E. & Becker, T. (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32, 52-63.
- Singhanian, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1), 13-18.
- Sharma, A. & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201–211.
- Shoosmith, V. M. (1918). *The study of Corn*. New York: Orange judd Company.
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S. & Fuchs, W. (2015). Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *Chemical Technology and Biotechnology*, 90(4), 648–657.
- Soro-Yao, A. A., Brou, k., Amani, G., Thonart, P. & Djè, K. M. (2014). The Use of Lactic Acid Bacteria Starter Cultures during the Processing of Fermented Cereal-based Foods in West Africa: A Review. *Tropical Life Sciences Research*, 25(2), 81–100.
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A. & Kocić-Tanackov, S. (2016), Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40: 990–998.
- Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 23-32.

- Teniola, O. D., Odunfa, S. A. (2001). The effects of processing methods on the level of lysine, methionine and the general acceptability of ogi processed using starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 1–9.
- Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P. (1987). *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. D.F: Instituto nacional indigenista. No. 16.
- Urizar, A. y Bressani, R. (1997). Efecto de la nixtamalización del maíz sobre el contenido de ácido fítico, calcio y hierro total y disponible. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 47(3), 217-23.
- Uthumporn, U., Zaidulb, I. S. M. & Karim, A. 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. (1995). *Estudios sobre la microbiología del pozol*. (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamentos de Alimentos y Biotecnología.
- Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. & Owens, D. J. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17, 251-256.
- Wacher, C., Cañas, A., Cook, P. E., Barzana, & Owens, J. D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 269-274.
- Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista digital universitaria*, 5 (8), 1-14.
- Wusirica, R., Bohn, M., Lai, J. & Kole, C. (2014). *Genetics, genomics and breeding of maize*. Florida: CRC Press.
- Zhong, Z. & Sun, X. S. (2005). Thermal characterization and phase behavior of cornstarch studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 453-459.

10. ANEXOS

Tabla A. Curva patrón para la determinación de carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico

Concentración de glucosa ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 480nm
10	0.101
20	0.222
30	0.332
40	0.456
50	0.559
60	0.686
70	0.787
80	0.872
90	0.955

$$A = 0.0108C + 0.01$$
$$r^2=0.9965$$

Donde **A**=absorbancia y
C= concentración de
glucosa ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla B. Curva patrón para la determinación de carbohidratos reductores por el método ácido dinitrosalicílico (DNS).

Concentración de glucosa (mg/mL)	Absorbancia a 540nm
0.1	0.115
0.2	0.306
0.3	0.494
0.4	0.687
0.5	0.877

$$A = 1.9035C - 0.0756$$
$$r^2=1.0000$$

Donde **A**=absorbancia y
C= concentración de
glucosa (mg/mL)

Tabla C. Medios de cultivo utilizados y condiciones de incubación de las placas de agar para determinar la cuenta viable de los grupos microbianos estudiados, condiciones establecidas a partir de Díaz (2003).

Medio de cultivo	Grupo microbiano	Intervalo estadísticamente confiable (UFC)	Condiciones de incubación
MRS	Bacterias lácticas	25-250	48 h a 30 °C
MRS-A*	Bacterias lácticas amilolíticas	25-250	48 h a 30 °C
MRS-X*	Xilanolíticos	25-250	48 h a 30 °C
APC	Mesófilos aerobios no lácticos	25-250	48 h a 37 °C
BRVG	Enterobacterias	15-150	24 h a 37 °C
PDA*	Hongos y levaduras	10-150	3 días a 30 °C

*Ver en la Tabla D su composición. +: Acidificado con ácido tartárico al 10% a un pH de 3.41 ± 0.02 .

Tabla D. Composición de los medios de cultivo MRS-A (Díaz, 2003) y MRS-X.

Componente	Concentración en medio MRS-A (g/L)	Concentración en medio MRS-X (g/L)
Almidón	20	0
Xilano (Xylan oat spelt)	0	20
Peptona	10	
Extracto de carne	10	
Extracto de Levadura	5	
Citrato diamoniacal	2.17	
Acetato de sodio	5	
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.207	
Sulfato de manganeso	0.056	
Fosfato dipotásico	2.62	
Agar bacteriológico	15	

Tabla E. Cuentas viables de los diferentes grupos microbianos estudiados expresadas como log ufc/g.

T (h)	BAL	BAAL	Xilanolíticos	MANL	Enterobacterias	Levaduras
0	8.42 ± 0.22	8.06 ± 0.03	8.45 ± 0.05	8.98 ± 0.08	6.79 ± 0.36	4.54 ± 0.10 v.e.
3	8.31 ± 0.32	7.84 ± 0.17	SD	SD	SD	SD
6	9.55 ± 0.18	8.80 ± 0.19	8.52 ± 0.22	8.53 ± 0.03 v.e.	7.49 ± 0.39	5.02 ± 0.18
9	9.06 ± 0.13	8.47 ± 0.02	SD	SD	SD	SD
12	9.58 ± 0.39	8.42 ± 0.06	8.13 ± 0.16 v.e.	9.30 ± 0.31	8.52 ± 0.21	6.14 ± 0.03
24	10.11 ± 0.30	9.51 ± 0.15	8.34 ± 0.34 v.e.	8.53 ± 0.15	7.78 ± 0.07	7.18 ± 0.03
48	9.75 ± 0.24	8.70 ± 0.22 v.e.	7.97 ± 0.21 v.e.	7.96 ± 0.11 v.e.	6.85 ± 0.32	7.68 ± 0.36
96	9.30 ± 0.22	8.12 ± 0.23 v.e.	8.26 ± 0.23 v.e.	7.96 ± 0.02	4.47 ± 0.07 v.e.	8.06 ± 0.17
144	8.67 ± 0.30	6.84 ± 0.17 v.e.	8.27 ± 0.16 v.e.	6.95 ± 0.10 v.e.	3.33 ± 0.29	6.51 ± 0.05 v.e.

Se muestra el promedio de 3 réplicas con su desviación estándar. MANL: mesófilos aerobios no lácticos, E: enterobacterias SD: sin determinar, ND: no detectado. v.e: valor estimado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si estadísticamente había diferencia significativa en la T_i , T_p y T_f con el tiempo de fermentación, se realizó un análisis de varianza de un factor con $\alpha=0.05$ para cada temperatura.

Planteamiento de hipótesis

H_0 : Con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la temperatura de la transición.

H_1 : Con el tiempo de fermentación habrá diferencia en la temperatura de la transición.

TABLA F. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA T_i

<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>
Entre grupos	3.03571	4	0.758927	3.16381055	0.11916685	5.19216777
Dentro de los grupos	1.1993	5	0.23988			
Total	4.23509	9				

De acuerdo al análisis realizado, no se rechaza la hipótesis nula: con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la T_i de la transición.

TABLA G. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA T_p

<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>
Entre grupos	2.98006	4	0.745015	4.31292694	0.07032418	5.19216777
Dentro de los grupos	0.8637	5	0.17274			
Total	3.84376	9				

De acuerdo al análisis realizado, no se rechaza la hipótesis nula: con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la T_p de la transición.

TABLA H. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA Tf

<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>
Entre grupos	1.2407376	4	0.3101844	1.90898097	0.2472932	5.19216777
Dentro de los grupos	0.8124345	5	0.1624869			
Total	2.0531721	9				

De acuerdo al análisis realizado, no se rechaza la hipótesis nula: con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la Tf de la transición.

Para determinar si estadísticamente había diferencia significativa en la ΔT con el tiempo de fermentación, se realizó un análisis de varianza de un factor con $\alpha=0.05$.

Planteamiento de la hipótesis

H₀: Con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la ΔT de la transición.

H₁: Con el tiempo de fermentación habrá diferencia en la ΔT de la transición.

TABLA I. ANÁLISIS DE VARIANZA DE ΔT

<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>
Entre grupos	0.7237234	4	0.18093085	13.9806707	0.00635784	5.19216777
Dentro de los grupos	0.0647075	5	0.0129415			
Total	0.7884309	9				

De acuerdo al análisis realizado, se acepta la hipótesis alternativa: con el tiempo de fermentación habrá diferencia en la ΔT de la transición.

Para ver entre qué tiempos de fermentación hubo diferencia significativa en la ΔT , se realizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

TABLA J. Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo de fermentación (días)		0	1	2	4	6
	Media	12.71	12.45	12.27	12.38	11.89
6	11.89	0.82*	0.56*	0.38	0.49*	-
4	12.38	0.82	0.07	0.11	-	
2	12.27	0.82	0.18	-		
1	12.45	0.26	-			
0	12.71	-				DHS=0.46

*Existe una diferencia significativa.

Para determinar si estadísticamente había diferencia significativa en la ΔH con el tiempo de fermentación, se realizó un análisis de varianza de un factor con $\alpha=0.05$.

Planteamiento de la hipótesis

H₀: Con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la entalpía de la transición.

H₁: Con el tiempo de fermentación habrá diferencia en la entalpía de la transición.

TABLA K. ANÁLISIS DE VARIANZA DE ΔH

<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>
Entre grupos	0.20215196	4	0.05053799	2.03622747	0.22746328	5.19216777
Dentro de los grupos	0.12409712	5	0.02481942			
Total	0.32624908	9				

De acuerdo al análisis realizado, no se rechaza la hipótesis nula: con el tiempo de fermentación no habrá diferencia en la entalpía de la transición.