



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

### **INFLUENCIA DE LA GRANULOMETRÍA EN LA MASA DE POZOL, SOBRE LA PRESENCIA Y DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

SARAH CAROLINA GONZÁLEZ PILLADO

TUTOR PRINCIPAL:

WACHER RODARTE MARÍA DEL CARMEN

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA AMELIA MARÍA DE GUADALUPE Facultad de Química

MONTIEL PACHECO CARMINA Facultad de Química

NAVARRO OCAÑA ARTURO Facultad de Química

TRUJILLO ROLDÁN MAURICIO ALBERTO Instituto de Investigación en Biomédicas

QUIRASCO BARUCH MARICARMEN Facultad de Química

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**Octubre, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

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

## **ASESOR DEL TEMA**

WACHER RODARTE MARÍA DEL CARMEN

## **SUPERVISOR TÉCNICO**

FABILA IBARRA LAUREL ELIDE

## **SUSTENTANTE**

GONZÁLEZ PILLADO SARAH CAROLINA

## **AGRADECIMIENTOS**

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto PAPIIT, UNAM IN223917

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido para el proyecto CONACyT, proyecto CB-2009-131615 ***'ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL POZOL CONJUNTANDO LAS CIENCIAS ÓMICAS, LA BIOFÍSICA Y LA MICROBIOLOGÍA PARA COMPRENDER LOS EVENTOS QUE OCURREN DURANTE SU FERMENTACIÓN***

Por su asesoría se agradece

RODRÍGUEZ SANOJA ROMINA Instituto de Investigación en Biomédicas.

RUIZ TERÁN FRANCISCO Facultad de Química

BERNAL LUGO IRMA Facultad de Química

MONTIEL PACHECO CARMINA Facultad de Química

CALDERÓN VILLAGÓMEZ HILDA ELIZABETH Facultad de Química

RAMIREZ CARRILLO REBECA Facultad de Química

DIAZ RUIZ GLORIA Facultad de Química

TERESA FLORES Facultad de Química

A mi familia por el apoyo y ánimo para poder cumplir esta meta.

## INDICE

	<b>Abreviaturas y símbolos</b>	
	<b>Resumen</b>	
<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Maíz</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Producción</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Historia</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Morfología de la planta de maíz</b>	<b>5</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Grano maduro de maíz</b>	<b>6</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Composición química del grano maduro de maíz</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Pozol</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Descripción</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Procesos de elaboración del pozol</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2.1</b>	<b>Nixtamalización</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2.2</b>	<b>Molienda o moturación</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2.3</b>	<b>Influencia de la nixtamalización y la molienda en la composición química de la masa de maíz</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2.4</b>	<b>Fermentación</b>	<b>17</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Microambientes</b>	<b>19</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Fuentes de inclusión de microorganismos en el pozol</b>	<b>20</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Microbiología del pozol</b>	<b>20</b>
<b>2.2.5.1</b>	<b>Bacterias ácido lácticas (BAL)</b>	<b>21</b>
<b>2.2.5.2</b>	<b>Bacterias ácido lácticas en el pozol</b>	<b>22</b>
<b>2.2.5.3</b>	<b>Bacterias no lácticas en el pozol</b>	<b>23</b>
<b>2.2.5.4</b>	<b>Microorganismos eucariontes en el pozol</b>	<b>23</b>
<b>2.2.5.5</b>	<b>Etapas del desarrollo de microorganismos en el pozol</b>	<b>24</b>
<b>2.2.5.6</b>	<b>Bacterias representativas en el pozol</b>	<b>25</b>
<b>2.2.5.7</b>	<b>Ejemplos de bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA) frecuentemente asilados de alimentos</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>29</b>

<b>4.1</b>	<b>Objetivos particulares</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Prueba preliminar</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Muestreo de pozol para prueba preliminar</b>	<b>31</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Fermentación del pozol para prueba preliminar</b>	<b>31</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Separación de fracciones y elección de procedimiento</b>	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Separación de fracciones</b>	<b>32</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Muestreo de pozol</b>	<b>32</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Fermentación de pozol</b>	<b>32</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Liofilización para separación de fracciones</b>	<b>32</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Tamizado para separación de fracciones</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Análisis para cada una de las fracciones</b>	<b>34</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Muestreo de fracciones</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Microbiología</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2.1</b>	<b>Identificación de microorganismos presentes en el pozol</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2.1.1</b>	<b>Bacterias ácido lácticas</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2.1.2</b>	<b>Enterobacterias</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2.1.3</b>	<b>Levaduras</b>	<b>35</b>
<b>5.3.2.1.4</b>	<b>Bacterias productoras de exopolisacaridos (EPS)</b>	<b>35</b>
<b>5.3.2.1.5</b>	<b>Bacterias mesófilas aeróbias</b>	<b>35</b>
<b>5.3.3</b>	<b>pH</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Análisis químicos</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4.1</b>	<b>Composición proximal</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4.1.1</b>	<b>Humedad</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4.1.2</b>	<b>Ceniza</b>	<b>36</b>
<b>5.3.4.1.3</b>	<b>Proteína</b>	<b>36</b>
<b>5.3.4.1.4</b>	<b>Extracto etéreo</b>	<b>36</b>
<b>5.3.4.1.5</b>	<b>Fibra cruda</b>	<b>37</b>
<b>5.3.4.1.6</b>	<b>Carbohidratos</b>	<b>37</b>
<b>5.3.4.2</b>	<b>Carbohidratos solubles</b>	<b>37</b>
<b>5.3.4.2.1</b>	<b>Carbohidratos reductores</b>	<b>38</b>

5.3.4.2.2	Carbohidratos totales	38
5.3.4.2.3	Almidón soluble	38
5.3.4.3	Productos de fermentación	39
5.3.4.4	Fibra (pared celular vegetal)	39
5.3.4.5	Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)	40
5.3.5	Estudio de microscopia electrónica de barrido	40
5.4	Análisis estadístico	41
6	Resultados y discusión	42
6.1	Prueba preliminar	42
6.3	Análisis de fracciones	43
6.3.2	Microbiología	43
6.3.3	pH	49
6.3.4	Análisis químicos	51
6.3.4.1	Composición proximal	51
6.3.4.2	Carbohidratos solubles	53
6.3.4.3	Productos de fermentación	55
6.3.4.4	Fibra (pared celular vegetal)	59
6.3.4.5	Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)	60
6.3.5	Estudio de microscopia electrónica de barrido	63
6.3.6	Resumen de resultados	64
7	Conclusión General	68
7.1	Conclusiones particulares	68
8	Perspectivas	70
9	Referencias	71
10	Anexos	78
10.1	Microbiología	78
10.2	pH	84
10.3	Análisis químicos	86
10.3.1	Composición proximal	86
10.3.2	Carbohidratos solubles	92
10.3.3	Productos de fermentación	96

<b>10.3.4</b>	<b>Fibra (pared celular vegetal)</b>	<b>99</b>
<b>10.3.5</b>	<b>Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)</b>	<b>101</b>
<b>10.4</b>	<b>Gramos por fracción</b>	<b>104</b>

## **FIGURAS**

<b>2.1</b>	Representación gráfica del maíz y teocintle	<b>4</b>
<b>2.2</b>	Partes de la planta de maíz	<b>5</b>
<b>2.3</b>	Estructura del grano de maíz	<b>6</b>
<b>2.4</b>	Gránulo de almidón de maíz observado en un microscopio (400x); 3A bajo luz normal, 3B bajo luz polarizada	<b>7</b>
<b>2.5</b>	Diagrama de los procesos de elaboración de pozoles mestizo e indígena	<b>11</b>
<b>2.6</b>	Vías de fermentación láctica; a) homoláctica, b) heteroláctica	<b>18</b>
<b>2.7</b>	Bacterias ácido lácticas en medio MRS	<b>21</b>
<b>5.1</b>	Diagrama de flujo del procedimiento experimental	<b>30</b>
<b>6.1</b>	Cuenta de microorganismos (UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>44</b>
<b>6.2</b>	Cambio de pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	<b>50</b>
<b>6.3</b>	Porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	<b>51</b>
<b>6.4</b>	Concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	<b>53</b>
<b>6.5</b>	Concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa	<b>56</b>



	de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	
<b>6.6</b>	Porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	<b>59</b>
<b>6.7</b>	Concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C	<b>61</b>
<b>6.8</b>	Microorganismos y estructuras en las fracciones fina (F) y gruesa (G), de la masa de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>63</b>

## CUADROS

<b>2.1</b>	Partes anatómicas del grano de maíz (porcentaje de las partes anatómicas)	<b>7</b>
<b>2.2</b>	Composición química del maíz blanco en porcentaje m/m	<b>9</b>
<b>2.3</b>	Composición química de maíz crudo y masa nixtamalizada (g/ 100g de maíz).	<b>17</b>
<b>6.1</b>	Porcentaje (m/m) de muestra liofilizada, retenida al ser tamizada por diferente No. de malla	<b>42</b>
<b>6.2</b>	Porcentaje (m/m) de cada fracción, fina y gruesa, obtenido al tamizar la muestra liofilizada por la malla No. 20	<b>43</b>
<b>6.3</b>	Resumen de resultados de los cambios en los compuestos y microorganismos encontrados en las fracciones fina y gruesa de la masa de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>66</b>
<b>10.1.1</b>	Cuenta de microorganismos (UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>78</b>
<b>10.1.2</b>	Análisis de varianza en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$ UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>79</b>
<b>10.1.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$ UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f)	<b>80</b>

	enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	
<b>10.1.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$ UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>83</b>
<b>10.2.1</b>	Valores de pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>84</b>
<b>10.2.2</b>	Análisis de varianza del pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>85</b>
<b>10.2.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias de pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>85</b>
<b>10.2.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>86</b>
<b>10.3.1.1</b>	Porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>86</b>
<b>10.3.1.2</b>	Análisis de varianza del porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>87</b>
<b>10.3.1.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en el porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>89</b>
<b>10.3.1.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>91</b>
<b>10.3.2.1</b>	Concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de	<b>92</b>

	pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	
<b>10.3.2.2</b>	Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>92</b>
<b>10.3.2.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>93</b>
<b>10.3.2.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>95</b>
<b>10.3.3.1</b>	Concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>96</b>
<b>10.3.3.2</b>	Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>96</b>
<b>10.3.3.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>97</b>
<b>10.3.3.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>98</b>
<b>10.3.4.1</b>	Porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>99</b>
<b>10.3.4.2</b>	Análisis de varianza del porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de	<b>99</b>

	fermentación a 30°C	
<b>10.3.4.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en el porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>100</b>
<b>10.3.4.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>100</b>
<b>10.3.5.1</b>	Concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>101</b>
<b>10.3.5.2</b>	Análisis de varianza de la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>101</b>
<b>10.3.5.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>102</b>
<b>10.3.5.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C	<b>103</b>
<b>10.4.1</b>	Valores de gramos en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>104</b>
<b>10.4.2</b>	Análisis de varianza de la cantidad en gramos, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>104</b>
<b>10.4.3</b>	Prueba Duncan para identificar las diferencias de la cantidad en gramos de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>104</b>
<b>10.4.4</b>	Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la cantidad en gramos de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C.	<b>105</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
*	Diferencia significativa
**	Diferencia altamente significativa
$\alpha$	Nivel de significación
°C	Grados centígrados
4300g	7500 rpm
a.C.	Antes de Cristo
ATP	Adenosin trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
BALA	Bacterias ácido lácticas amilolíticas
d.C.	Después de Cristo
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
Desv. Std.	Desviación estándar
DNS	Método ácido dinitrosalicílico
EPS	Productores de exopolisacaridos
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia
IR	Índice de refracción
Log <sub>10</sub>	Logaritmo base 10
M	Molar
m/m	masa / masa
m/v	masa / volumen
mg	Miligramo
mg/g	miligramo / gramo
mg/mL	miligramos / mililitro
mL	Mililitros
mL/min	mililitro / minuto
mL/mL	mililitro /mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MRS	Agar Man, Rogosa y Sharpe
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
nm	Nanómetros
No.	Número
NS	no existe diferencia significativa
NS	no existe diferencia significativa
PC	Pared celular
PCA	Agar cuenta en placa
PDA	Agar papa dextrosa
pH	Potencial de hidrógeno
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

rps	Revoluciones por segundo
sp.	No se ha determinado la especie
ssp.	Varias especies del mismo género
std.	Estándar
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFC/g	Unidades formadoras de colonia / gramo
v/v	volumen / volumen
VRB	Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μmol/g	micromol / gramo

## RESUMEN

El pozol es una bebida fermentada no alcohólica, elaborada a base de maíz y consumida principalmente en el sureste de México. Para su elaboración, el maíz se nixtamaliza, se muele, se amasa y se forman bolas de diferentes tamaños las cuales se envuelven en hojas de plátano para su posterior fermentación. Durante la fermentación de la masa de pozol, crecen microorganismos que lo acidifican y se producen aromas y texturas con características diferentes a las de la masa sin fermentar. Las bacterias lácticas (BAL) producen ácidos orgánicos. También crecen otras bacterias, levaduras y mohos. Las BAL son las principales integrantes en el pozol y dentro de ellas se encuentran las bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA). El pozol se elabora a base de maíz, uno de cuyos componentes mayoritarios es el almidón. También contiene celulosa y hemicelulosa, que durante la nixtamalización se hacen disponibles y los microorganismos las fermentan, disminuyendo el valor de pH. El objetivo de este trabajo fue determinar si existían diferencias en la composición química y en el desarrollo de microorganismos en las partículas con diferente tamaño de partícula de masa de nixtamal y durante su fermentación. Para este estudio se fermentó la masa de nixtamal y se tomaron muestras a las 0, 18.5, 24 y 48 h. Se liofilizó y se separó en dos tipos de fracción (fina y gruesa), la fracción fina se clasificó como la porción de masa que atravesó la malla número 20 (850  $\mu\text{m}$ ) y la fracción gruesa como la porción de masa que quedó retenida en la malla número 20. Se realizaron en cada fracción cuenta en placa de microorganismos, determinación de pH, análisis proximal, determinación de carbohidratos solubles, determinación de productos de fermentación, cuantificación de fibra correspondiente a la pared celular vegetal, cuantificación indirecta de celulosa y hemicelulosa y se realizó microscopía electrónica de barrido. Se observó que los microorganismos de todos los grupos microbianos presentaron aumento en sus cuentas conforme avanzaba la fermentación (mesófilos aerobios, BAL, BALA y bacterias productoras de exopolisacaridos (EPS) iniciaron con cuentas de E +04 y finalizaron con E +07, las levaduras iniciaron con E +03 y finalizaron con E +05, las enterobacterias se presentaron al final de la fermentación con cuentas de E +04). El grupo EPS al final de la fermentación en la fracción fina presentó un descenso en su cuenta de 7.6 E +06 a 2.2 E +06. En la fracción gruesa al final de la fermentación la cuenta de

microorganismos fue mayor en comparación con la fina. El pH disminuyó gradualmente, conforme avanzó la fermentación (iniciando con un valor 7.2 y finalizando con 4.9 - 5.0). En el análisis proximal se encontró que los porcentajes de grasa, ceniza y fibra fueron mayores en la fracción gruesa (fina, 3.2, 1.2 y 1.2; gruesa 4.2, 1.3 y 1.8, respectivamente) y los carbohidratos se encontraron en mayor porcentaje en la fracción fina (fina 84.2, gruesa 82.4), además de presentarse diferencias entre fracciones al inicio y al final de la fermentación. Con respecto a la concentración de carbohidratos totales, reductores y almidón soluble, a lo largo de la fermentación (fina 34.0, 2.3 y 16.6; gruesa 27.9, 1.6 y 17.1, valor promedio mg/g de masa, respectivamente). Carbohidratos totales y almidón, en la fracción fina al inicio se presentó un aumento y después un descenso; en la fracción gruesa esta variación fue de forma opuesta ya que al principio se presentó un descenso y después un aumento, al final de la fermentación en ambas fracciones se presentó un descenso en la concentración. Durante todo el periodo de fermentación analizado, los carbohidratos reductores presentaron mayor concentración en la fracción fina en comparación con la gruesa. En los productos de fermentación, no se observó diferencia en la concentración de sacarosa ni de fructosa (1.8 y 0.8 mg/g de masa, respectivamente en ambas fracciones) la concentración de ácido láctico fue en aumento (no detectándose al inicio y finalizando en la fracción fina con 1.3 y en la gruesa con 1.1). El porcentaje de fibra proveniente de la pared celular vegetal, fue mayor en la fracción gruesa en comparación con la fracción fina (fina 5.9 y gruesa 7.5). En dicha pared celular vegetal se determinaron las concentraciones de xilosa y de glucosa, que se tomaron como medida indirecta de la concentración de hemicelulosa y de celulosa, respectivamente. Se observó que para ambas fracciones las concentraciones de xilosa y de glucosa fueron mayores en la fracción gruesa (fina 83.4, 133.8; gruesa 90.0, 170.9, valor promedio mg/g de pared celular vegetal, respectivamente), con excepción de la concentración al final de la fermentación donde se presentó una mayor concentración de hemicelulosa en la fracción fina (fina 83.6 y gruesa 78.2). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido, permitieron observar la degradación gradual del almidón y el aumento en los microorganismos conforme avanza la fermentación, además de la diferencia entre las estructuras de las fracciones fina y gruesa. Se concluyó que existen diferencias entre las fracciones fina y gruesa a lo largo de la fermentación, con respecto a la composición proximal y a la fibra de pared celular vegetal.



Esta diferencia está influenciada principalmente por la distribución ocasionada por el tamaño de partícula. Los resultados obtenidos a lo largo de la fermentación para pH, carbohidratos solubles y productos de fermentación, reflejaron el desarrollo de microorganismos en el tiempo analizado para la fermentación realizada en este estudio.

# 1 INTRODUCCION

El pozol es una bebida refrescante, ácida, no alcohólica, que se obtiene de la fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado (Ulloa y cols., 1987; Wachter y cols., 2000). Dentro de la microbiota de este alimento se han encontrado bacterias lácticas (BAL) y lácticas amilolíticas, como *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* y *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* (Wachter y cols., 2000); además de enterobacterias, bacterias mesófilas aerobias, bacterias productoras de exopolisacáridos (EPS), entre otras (Ampe y cols., 1999). El componente mayoritario del maíz es el almidón. Estructuralmente el maíz consta de germen, endospermo y una cubierta llamada pericarpio. El germen contiene aminoácidos, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas. El endospermo está formado por gránulos de almidón embebidos en una matriz proteica y el pericarpio contiene hemicelulosa, celulosa y minerales. El maíz también es rico en fósforo, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro selenio y contiene pequeñas cantidad de potasio y calcio (Chaudhary y cols., 2013).

Dentro del proceso para la elaboración del pozol, dos pasos son fundamentales para este estudio, la nixtamalización y la molienda. La nixtamalización consiste en hervir los granos de maíz en agua con cal, lavarlos y dejarlos en reposo en agua limpia. Éstos se conocen como nixtamal. Durante este proceso algunos de los componentes sufren cambios: la concentración de cenizas se incrementa y el contenido de calcio aumenta en el nixtamal (Domínguez-Ramírez y cols., 2017). La estructura de las proteínas se altera, así como su solubilidad y se incrementa la disponibilidad de aminoácidos esenciales, como el triptófano y lisina (Paredes-López y cols., 2009). El almidón sufre una gelatinización parcial, se retrograda y se forman complejos amilosa-lípidos (Domínguez-Ramírez y cols., 2017; Paredes-López y cols., 2009). Por otra parte, para la elaboración del pozol el maíz nixtamalizado se muele, por lo que pierde su estructura y la masa resultante consiste en fragmentos de germen, residuos de pericarpio y endospermo parcialmente gelatinizado (Paredes-López y cols., 2009). La molienda de los granos obtenidos es la etapa del proceso en la cual se incorpora la mayoría de los microorganismos que se desarrollarán durante la fermentación (Holzapfel, 2014). La etapa de la molienda es determinante en cuanto a la granulometría del producto. Los granos de nixtamal no se muelen finamente, sino que se “martajan”, de manera que la masa contiene fragmentos de diferentes tamaños que seguramente difieren en su composición de fibra, grasa y proteína, de partes de pericarpio y

de germen no eliminados en etapas previas (cocción del maíz en álcali y lavado del mismo). En la masa se encuentran partículas de grano con tamaño variable, que deben tener composición diferente, esto puede influir en la diversidad de los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación y que afectan las características finales del producto. Es posible entonces que la composición química de cada fragmento sea diferente y que como consecuencia de esto existan diferencias en cuanto a los grupos microbianos que se desarrollen en cada uno. En este trabajo se pretende determinar si existen diferencias en la composición de dos fracciones de masa de diferente tamaño y si esto favorece la presencia, al desarrollo y el orden de aparición de los microorganismos presentes durante la fermentación de la masa de nixtamal.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 MAÍZ**

#### **2.1.1 Producción**

En México, el maíz representa el componente más importante de la producción agrícola, y una gran parte de la superficie está destinada a la agricultura (Bartolo-Pérez y cols., 1999) además de que la subsistencia de campesinos y pequeños agricultores depende de ésta (Othón, 2001). Este año (octubre 2016-septiembre 2017) se prevé una producción de 23.3 millones de toneladas. En los últimos cuatro años (de 2013 a 2016) la producción de maíz aumentó de 28.1 por ciento, al incrementarse de 17.3 millones de toneladas a más de 22 millones de toneladas reportadas. Esto representa una tasa media de crecimiento anual de 6.4 por ciento y un producción promedio de 19.1 millones de toneladas (SAGARPA, 2017). Es importante recalcar el hecho de que el maíz y sus productos proporcionan diversos campos para desarrollar y aprovechar dentro del mercado, como es la creciente demanda de alimentos y el desarrollo de nuevos productos a nivel mundial.

#### **2.1.2 Historia**

Durante miles de años se ha cultivado permanentemente el maíz (*Zea mays*) en América Central. La primera evidencia sobre el cultivo del maíz se encuentra en los granos de polen fosilizados desde hace más de 80 mil años que se encontraron en muestras tomadas de los sedimentos del lago debajo de la Ciudad de México. Los restos arqueológicos en México y América Central demuestran que la población estaba constituida inicialmente por cazadores y nómadas y que las cosechas, que eran escasas, proporcionaban recursos limitados para sobrevivir, pero hacia el año 2500 a.C. se domesticó el maíz y mucho después, entre los años 250 y 1600 d.C. las civilizaciones Maya, Tolteca y Azteca cruzaron el maíz para aumentar los rendimientos (Dendy y Dobraszczyk, 2004).

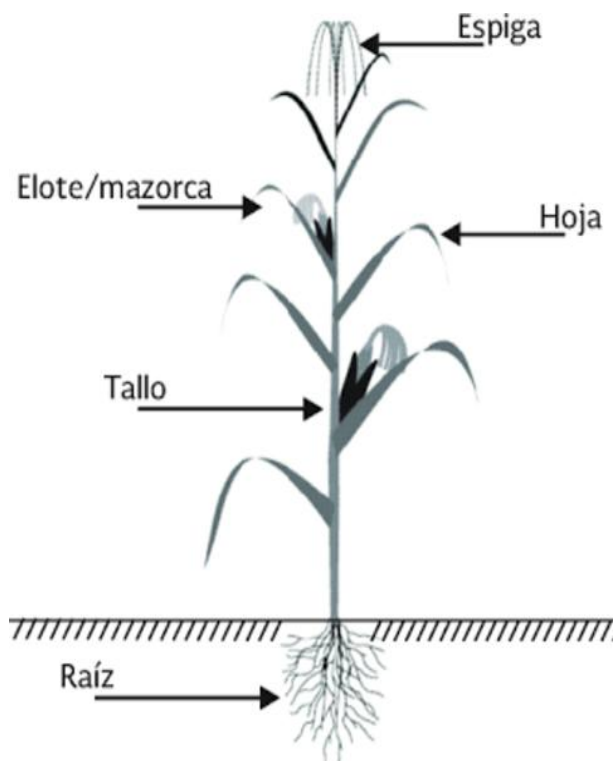
No se conoce bien el origen del maíz, algunos especialistas creen que la planta silvestre “teocintle” (*Zea mexicana* o *Euchlaena mexicana*) (Figura 2.1) que es una gramínea herbácea anual que crece en América Central parecida al maíz, formó parte del ancestro del maíz, otros sugieren que se originó en América del Sur a partir de un maíz primitivo que

tenía sus semillas en vainas o con una especie de cubierta, la única evidencia física de maíz con estas características es el descubrimiento en una cueva de Nuevo México y se estimó que tenía 4 mil años. En estudios recientes el maíz encontrado en lugares antiguos presenta ambas particularidades, lo que sugiere que las dos teorías podrían ser correctas y que el maíz moderno es un híbrido de un maíz con vaina que no ha vuelto existir y del teosinte (Dendy y Dobraszczyk, 2004).



**Figura 2.1:** Representación gráfica del maíz y teocintle (Rodríguez-Mega y Hernández-Marroquín, 2013).

### 2.1.3 Morfología de la planta de maíz



**Figura 2.2:** Partes de la planta de maíz (Flores-Gallardo y cols., 2013).

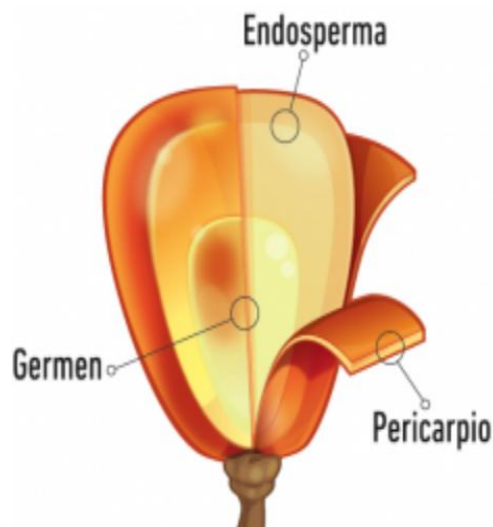
La altura de la planta depende de la variedad, ya que en algunas puede ser de 2 metros y otras llegar hasta 6 metros. Cada planta tiene un tallo alto y leñoso, que termina en un penacho donde se produce el polen. La mazorca madura de maíz contiene aproximadamente de 300 a 800 granos que se unen a la mazorca mediante una estructura llamada pedicelo (Figura 2.2). Cuando el maíz se utiliza para alimentación animal se dejan en la mazorca, pero para alimentación humana se separan de la mazorca mediante un proceso llamado desgranado.

El maíz tiene muchos usos, principalmente en la industria molinera en la cual se obtienen: almidón refinado, proteína (gluten), fibra (pericarpio) y aceites (mediante el procesamiento del germen), conjuntamente una de las industrias que está creciendo a un alto ritmo es la producción de harinas nixtamalizadas, además de los productos obtenidos a partir de masa fresca (Othón, 2001; Dendy y Dobraszczyk, 2004; Chaudhary y cols., 2013).

### 2.1.4 Grano maduro de maíz

Morfología y estructura del grano maduro (Othón, 2001; Dendy y Dobraszcyk, 2004):

Los granos de las distintas variedades de maíz son duros (menos la del maíz dulce), y en ellos se distinguen las partes que se observan en la figura 2.3 y porcentajes en el cuadro 2.1.



**Figura 2.3:** Estructura del grano de maíz (DACSA GROUP, 2017).

- El pericarpio rodea al endospermo y al germen, pero no al pedicelo. Se caracteriza por tener un alto contenido de fibra y cenizas, así como por carecer de almidón.
- El endospermo se encuentra fuertemente asociado a la aleurona por lo que permanecen juntos durante el proceso de molienda. Las células del endospermo son grandes y con paredes celulares delgadas, las cuales tienen un alto contenido de fibra insoluble (celulosa) y soluble (betaglucanos y pentosanas), estas células contienen a los gránulos del almidón con incrustaciones de cuerpos proteicos los cuales están formados principalmente por las prolaminas (llamadas zeínas en el maíz), que son la fracción proteica más abundante en todos los cereales.
- El germen del maíz es grande, en comparación con otros cereales, es fácil de extraer y se caracteriza por no contener almidón y sí proteínas, carbohidratos solubles, enzimas, minerales y vitaminas.

**Cuadro 2.1:** Partes anatómicas del grano de maíz (porcentaje de las partes anatómicas) (FAO, 1993).

Pericarpio	Aleurona	Endospermo	Germen
5.0 – 6.0	2.0 – 3.0	80.0 – 85.0	10.0 – 12.0

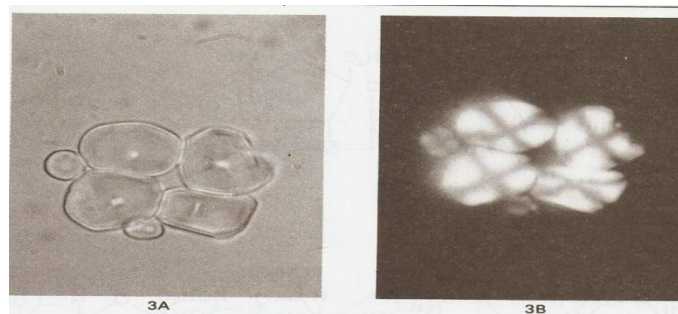
### 2.1.5 Composición química del grano maduro de maíz (Othón, 2001; Dendy y Dobraszczyk, 2004, Chaudhary y cols., 2013)

- Carbohidratos:

Los carbohidratos del grano son principalmente carbohidratos de reserva (almidón almacenado en gránulos), un pequeño porcentaje de carbohidratos estructurales (fracción fibrosa) y carbohidratos solubles.

- Almidón: es un polímero de glucosa unida por enlaces alfa 1-4 y alfa 1-6, conformados por moléculas de amilopectina y amilosa. A la amilopectina también se le conoce como almidón ramificado y constituye el 75 % en la mayoría de los cereales, gran parte de sus enlaces glucosídicos corresponden a uniones alfa 1-4 y las ramificaciones poseen enlaces alfa 1-6 que sólo constituyen un 4 % ó 5 % del total de los enlaces. Con respecto a la amilosa, sólo corresponde al 25 % en la mayoría de los cereales y está formada exclusivamente por enlaces alfa 1-4.

Los gránulos de almidón están organizados estructuralmente, su crecimiento es gradual y en forma concéntrica (Figura 2.4). Todos los gránulos de almidón tienen un punto llamado hilum y es el punto del que parte el depósito del almidón sintetizado.



**Figura 2.4:** Gránulo de almidón de maíz observado en un microscopio (400x); 3A bajo luz normal, 3B bajo luz polarizada (Othón, 2001).



- Carbohidratos solubles: éstos se encuentran principalmente en el germen, corresponden a un porcentaje pequeño cercano al 2 % y están constituidos básicamente por fructosa, glucosa y sacarosa.
- Carbohidratos estructurales: están constituidos por fibra soluble e insoluble. La fibra insoluble está formada básicamente de celulosa y hemicelulosa y está situada principalmente en el pericarpio. La celulosa es un polímero lineal de enlaces beta 1-4 y la hemicelulosa es un polímero ramificado de diversos azúcares: D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y D-glucosa; basándose en los principales residuos de azúcar presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas se pueden clasificar en xilanos, arabinanos, galactosanos y glucomananos, siendo los xilanos y glucomananos los más abundantes (Sandoval; 2005). La fibra soluble se conforma por betaglucanos y pentosanas, los cuales están presentes principalmente en las paredes celulares. Los betaglucanos son polímeros de glucopiranosilo unido por enlaces 1-4 y 1-3, las pentosanas son similares a la hemicelulosa y se conforman por pentosas como arabinosa y xilosa.

- Proteínas.

Se localizan principalmente en el germen y en la capa de la aleurona y se clasifican según su solubilidad en:

- Albúminas: solubles en agua.
- Globulinas: solubles en soluciones salinas diluidas.
- Prolaminas: solubles en soluciones alcohólicas.
- Glutelinas: solubles en álcalis o ácidos diluidos.

Las albúminas y globulinas se encuentran básicamente en el germen y tienen el mejor balance de aminoácidos ya que son ricas en lisina.

Las prolaminas se encuentran en los cuerpos proteicos en el endospermo, como proteínas de almacenamiento. Se caracterizan por ser ricas en aminoácidos no esenciales como prolina, glicina, ácido glutámico y carecer de aminoácidos esenciales.

Las glutelinas son las más difíciles de extraer por tener un alto número de puentes disulfuro y están situadas en la matriz proteica del endospermo ya que su función es estructural. Son proteínas con triptófano.

- Lípidos.

Se encuentran en el germen y se clasifican en saponificables y no saponificables. Entre los saponificables están los polares (monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y glicolípidos), y en los no polares, dentro de los cuales los triglicéridos son la fracción más abundante, ya que son la principal forma de almacenamiento de los lípidos. Existen también los insaponificables, conformados por esteroides, tocoferoles y carotenoides.

**Cuadro 2.2** Composición química del maíz blanco en porcentaje m/m (FAO, 1993).

<b>Producto</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Grasas</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Fibra cruda</b>	<b>Hidratos de carbono</b>	<b>Calorías (por 100g)</b>
<b>Maíz Blanco</b>	15.9	8.1	4.8	1.3	1.1	70.0	356
<b>Maíz Amarillo</b>	12.2	8.4	4.5	1.1	1.3	73.9	370

## **2.2 POZOL**

### **2.2.1 Descripción**

El pozol es una bebida refrescante ácida no alcohólica, fermentada a base de maíz. Dentro del proceso de fermentación, el alimento se transforma por acción de los microorganismos (Wacher, 2014). Durante la fermentación, existen reportes microbiológicos, que demuestran que las bacterias ácido lácticas (BAL) son el grupo dominante (Wacher y cols., 2000), dentro de este grupo de bacterias destacan las amilolíticas como *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* y *Streptococcus infantarius*, al ser el almidón el componente más abundante y el sustrato principal de este producto (Díaz-Ruíz y cols., 2003), ya que ayudan a la degradación de éste proporcionando carbohidratos más simples para microorganismos no amilolíticos; por otra parte en el pozol también se encuentran levaduras, hongos y bacterias mesófilas no lácticas (Ampe y cols., 1999).

El pozol es alimento tradicional de origen maya que forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México. El nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso (Flores-Ramírez, 2017). Para su preparación el maíz se cuece en agua con cal para obtener nixtamal, se muele y se amasa, se le da forma de bola para ser envuelta en hojas de plátano y se deja fermentar de 2 a 7 días o más a temperatura ambiente. Durante la fermentación se encuentran los microorganismos de la microbiota propia de los granos, que seguramente se encontrarán en el ambiente, así como de otros que pudieran introducirse a la masa en las diversas etapas del proceso, los cuales le dan las características típicas (principalmente el sabor ácido de este producto); entre ellas básicamente bacterias ácido lácticas. Las bolas de pozol se suspenden en agua para preparar la bebida.

A esta bebida-alimento también se le atribuyen usos medicinales, para rituales y, debido a su alto grado de conservación, las bolas de pozol son utilizadas como provisiones en travesías largas. Los lacandones utilizan el pozol mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea (Flores-Ramírez, 2017).

### **2.2.2 Procesos de elaboración del pozol**

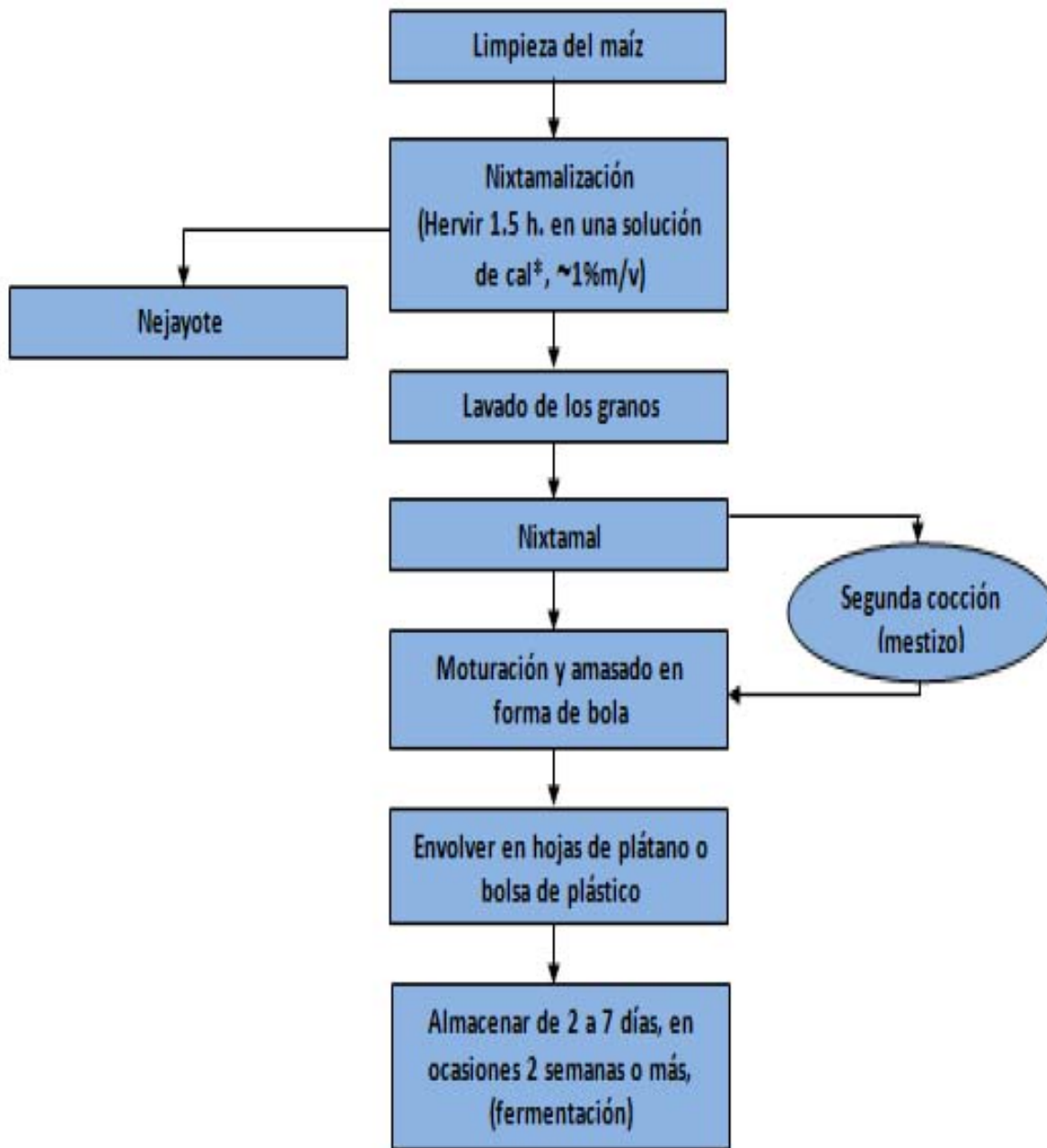
El pozol es consumido tradicionalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Quintana Roo (Ampe y cols., 1999), por mestizos e indígenas en el sur de México, para los cuales es uno de los alimentos que componen su dieta diaria (Escalante y cols., 2001).

La costumbre entre los indígenas es consumir los tres tipos de pozol (blanco, amarillo o negro) por igual, aunque piensan que el amarillo y el negro tienen más “vitaminas”, y el pozol que consumen más los mestizos es el blanco (Flores-Ramírez, 2017).

En Los Altos de Chiapas existen dos procesos principales para su elaboración, el mestizo y el indígena (Wacher y cols., 2000). En Villahermosa, Tabasco se realiza principalmente el proceso indígena (Cañas y cols., 1993) (Figura 2.5).

El proceso mestizo modifica el proceso tradicional indígena añadiendo un paso extra de cocción a los granos del nixtamal lo cual reduce al final la cantidad de sedimento sólido

presente en la bebida cuando la masa es suspendida en agua; lo anterior es motivado por el desagrado de este sedimento en la comunidad mestiza (Wacher y cols., 2000).



**Figura 2.5:** Diagrama de los procesos de elaboración de pozoles mestizo e indígena (modificado de Cañas y cols., 1993).

\*Nombre comercial de la cal hidratada,  $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$ .

### 2.2.2.1 Nixtamalización

La palabra proviene de nixtamal, del náhuatl: *nextli*, o cenizas de cal, y de *tamalli*, masa de maíz cocida (Othón, 2001). Es un proceso ampliamente practicado en México y Centroamérica, no se sabe con certeza cuándo fue que comenzó a dársele un tratamiento alcalino al maíz, pero ello constituyó un factor clave en el desarrollo de las culturas prehispánicas en Mesoamérica (Othón, 2001; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007).

En la nixtamalización, se cuecen los granos de maíz en una disolución de cal (hidróxido de calcio hidratado) aproximadamente al 1 % m/v durante 1.5 h (antiguamente se usaron cenizas de hoguera como fuente de cal para llevar a cabo la nixtamalización; hoy, los artesanos y fabricantes a gran escala utilizan cal industrializada; por otra parte la duración del tiempo de cocción del maíz varía según las tradiciones locales), a una temperatura cercana al punto de ebullición (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Wachter y cols., 2000; Othón, 2001; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007).

Después de la cocción, el maíz se lava con el fin de eliminar el pericarpio de los granos (esta operación se realiza a mano de modo tradicional, mecánicamente en preparaciones a pequeña escala y en mayor escala en la producción industrial), posteriormente se elimina el agua de lavado llamada nejayote y los granos de maíz resultantes conocidos como nixtamal se utilizarán para elaborar el pozol (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Othón, 2001; Wachter y cols., 2000; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007).

Durante la cocción y el remojo de este proceso, se ha observado que se producen cambios químicos y estructurales en los granos de maíz, tales como:

- Facilidad de eliminación del pericarpio, ya que la cal debilita las paredes celulares (Othón, 2001; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007; Ruiz y cols., 2009).
- Se solubiliza la pared celular del endospermo periférico, dando lugar a una hinchazón y destrucción parcial de los gránulos de almidón (Ruiz y cols., 2009), además influye en la gelatinización del almidón, por lo que al absorber agua, contribuye al aumento de actividad acuosa y por lo tanto al desarrollo de microbiota (se inicia con un 12 % de humedad en el grano y se alcanza una humedad final en el nixtamal de 36 %) (Othón, 2001). Anteriormente se creía que durante la nixtamalización, una gran parte de los almidones eran gelatinizados, sin embargo hoy, con el uso de técnicas más modernas, se

sabe que sólo es una porción pequeña, que no sobrepasa el 15 % (Salinas-Moreno y cols., 2003). Esta gelatinización parcial de los gránulos de almidón hace que las moléculas de amilopectina y amilosa sean más susceptibles al ataque enzimático (Othón, 2001).

- Con respecto a la proteína, disminuye ligeramente la digestibilidad, ya que modifica la apariencia de los cuerpos proteicos dado que insolubiliza a las prolaminas incrementando el entrecruzamiento con puentes disulfuro, además disminuye la biodisponibilidad de la lisina en consecuencia de que el cocimiento con cal también insolubiliza a globulinas y albúminas (Othón, 2001; Ruiz y cols., 2009).
- La nixtamalización contribuye al cambio de pH llegando a un valor cercano a la neutralidad en la masa para pozol (Díaz-Ruiz y cols., 2003).

Por otra parte la nixtamalización aumenta el valor nutricional de los productos elaborado como:

- El aumento en el contenido de cenizas por la absorción de cal, da lugar a un incremento considerable del contenido de calcio. En particular se ha visto que durante el cocimiento alcalino del maíz, la mayor parte del calcio es retenido en el pericarpio; por lo que es de primordial importancia el hecho de que cierta cantidad del pericarpio que no se desecha junto con en el nejayote pasa a formar parte de la masa o de la harina (Bartolo-Pérez y cols., 1999).
- Aumenta la biodisponibilidad de vitaminas, como la niacina ya que ésta se encuentra en la capa de la aleurona de forma ligada o libre, donde la forma ligada no es bien aprovechada por el organismo, pero el tratamiento alcalino rompe el enlace glucosídico que la mantiene ligada por lo que incrementa su biodisponibilidad y evita la enfermedad de la pelagra a quienes consumen productos derivados del nixtamal. Aunque también ocurren pequeñas pérdidas de algunos nutrientes como proteína, fibra y carbohidratos (principalmente carbohidratos solubles y algunos almidones se dispersan en el líquido) (Othón, 2001; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007; Ruiz y cols., 2009).

También se ha reportado que la masa obtenida contiene fragmentos de germen, pericarpio, aleurona y endospermo, así como almidón libre y lípidos disueltos; indicando que la capa

de aleurona y algunos estratos del pericarpio se conservaban y que el germen permanece sujeto al endospermo (Ruiz y cols., 2009).

En la actualidad, la utilización del procedimiento tradicional está restringido a una parte del medio rural y a pequeñas áreas urbanas, ya que para su elaboración se prefiere utilizar comúnmente harinas de masa previamente nixtamalizadas (Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007).

### **2.2.2.2 Molienda o moturación**

La molienda se lleva a cabo en un molino comercial o a mano en un metate para la formación de la masa. En forma comercial el nixtamal limpio se canaliza hacia un molino especial de martillos que actúa como un metate que motura el grano en pedazos de masa gruesos, éstos se secan hasta llegar a una humedad final de 8 a 10 % , después del secado las partículas se remuelen en un molino de martillos y se envían a un clasificador de partículas (tamices) para obtener varios tamaños del producto seco nixtamalizado; finalmente se mezclan diferentes proporciones de las harinas con granulometrías diversas para llenar especificaciones para tortilla de mesa, tamales o fritura (Othón, 2001).

En 1988 Pflugfelder y colaboradores estudiaron la masa para tortillas, masa para productos extruídos y masa para totopos; trabajaron con muestras de dos plantas industriales, cada una de ellas tenía procesos diferentes en cuanto a intensidad de las condiciones y tiempo de nixtamalización, ya que uno era más corto en comparación con la de la otra planta. Fraccionaron cada una de las muestras al poner la masa en agua y haciéndola pasar por diferentes tamices, obteniéndose una fracción líquida y tres fracciones sólidas, las cuales fueron clasificadas en función del tamaño de partícula. Las partículas con tamaño menor de 63  $\mu\text{m}$  contenían un 90 % de gránulos de almidón, las inferiores a 825  $\mu\text{m}$  contenían partes del endospermo y la composición de partículas de tamaño superiores a 825  $\mu\text{m}$  contenían principalmente partes de pericarpio y del germen. La fracción líquida contenía sólidos disueltos (almidón soluble, fibra soluble y una pequeña cantidad de proteína y de calcio) y lípidos parcialmente emulsificados. Concluyeron que la masa es un conjunto de partículas grandes de endospermo, germen y pericarpio, disperso en un cúmulo de

pequeños fragmentos de células de maíz con gránulos de almidón libre parcialmente gelatinizado, unido todo mediante sólidos disueltos y lípidos dispersos.

En estudios anteriores a éste se consideraba que la masa era un sistema homogéneo con composición y propiedades físicas uniformes, pero actualmente se considera a la masa como una mezcla de fracciones (Sahai y cols., 2001).

En la elaboración del pozol de forma tradicional se usa el metate, el cual consiste en una base de piedra cóncava en la parte central posicionada en forma inclinada y se usa una piedra en forma rectangular con los ángulos redondeados para moler el nixtamal donde se obtiene una masa con partículas de diferente tamaño (Othón, 2001). En la elaboración de la masa a partir del nixtamal, por no ser ésta una operación con el fin de producir harinas, no se separa el germen.

La etapa de molienda del proceso para obtener pozol tiene influencia principalmente en el tamaño de partícula, que debe afectar en la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos y también en la composición química.

En los procesos industriales, el tamaño de partícula podrá ser más pequeño, uniforme y homogéneo en comparación con el proceso tradicional que rinde un tamaño variado y en general con partículas grandes.

Con respecto a la composición química, principalmente se modifica la cantidad de lípidos y fibra ya que en el proceso industrial se elimina el germen y el pericarpio; y en el proceso tradicional sólo se elimina parte del pericarpio en la nixtamalización (Othón, 2001).

### **2.2.2.3 Influencia de la nixtamalización y la molienda en la composición química de la masa de maíz**

El maíz es la base de este alimento, por lo que conocer su composición proximal es importante ya que es interesante observar cómo influye ésta para el desarrollo de microorganismos y por lo tanto en la aparición u orden de aparición de sus características sensoriales.

Los carbohidratos representan la fracción principal en los cereales, ya que contienen de 50 a 70 % del peso seco; el endospermo de maíz contiene aproximadamente de 86 a 89 % de almidón, el cual se encuentra organizado en gránulos (Agama-Acevedo y cols., 2004). El



almidón es un polímero de glucosa compuesto por dos macromoléculas de diferentes estructuras amilosa (lineal) y amilopectina (ramificado) (Laguna y cols., 2009; Agama-Acevedo y cols., 2004); este polisacárido se encuentra dentro de una matriz proteica (Chaudhary y cols., 2013). Se sabe que mediante el tratamiento de nixtamalización se solubilizan parte de estas proteínas que rodean los gránulos de almidón quedando éste en forma libre (Bello-Pérez y cols., 2002; Agama-Acevedo y cols., 2004). El pericarpio que rodea al endospermo se desprende (Paredes-López y cols., 2008; Bello-Pérez y cols., 2002) y durante el remojo el agua difunde hacia el endospermo, ocasionando un hinchamiento de los gránulos de almidón (Medina y Salas, 2008; Hernández-Medina y cols., 2008). Posteriormente, durante la molienda del nixtamal, las células del endospermo se rompen quedando el almidón disponible (Bello-Pérez y cols., 2002; Agama-Acevedo y cols., 2004). También es importante señalar que durante la nixtamalización una parte del almidón se gelatiniza, esto se debe posiblemente a que los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  estabilizan la estructura del gránulo de maíz (Robles y cols., 1988); por lo que la mayor parte de la gelatinización se debe a la fricción durante la molienda (Bello-Pérez y cols., 2002). El que el endospermo presente todos estos cambios fisicoquímicos, proporciona a los microorganismos principalmente a las BALA almidón que puede ser fermentado para liberar carbohidratos que puedan ser usados por los microorganismos no amilolíticos (Holzapfel, 2014).

La celulosa tiene regiones altamente ordenadas por puentes de hidrógeno, lo cual se conoce como zonas cristalinas, que le dan el carácter de rigidez e insolubilidad, así como de resistencia al ataque enzimático, por lo que si se rompen estos puentes de hidrógeno se crean regiones amorfas que permiten la hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático (Bayer y cols., 2013; Lynd y cols., 2002; Castro-Martínez y cols., 2009). La hemicelulosa está constituida por polisacáridos solubles en álcali, tiene como componente principal al xilano y presenta menor grado de polimerización que la celulosa, por lo que es más accesible al ataque enzimático (Castro-Martínez y cols., 2009; Cooper-Bribiesca, 2013). En la nixtamalización del maíz y su molienda se degradan ambos polisacáridos. La lignocelulosa (complejo de celulosa-hemicelulosa-lignina) se degrada durante el tratamiento alcalino. La celulosa pierde su carácter cristalino y la hemicelulosa se solubiliza, por lo que hay un incremento en el área de superficie (Castro-Martínez y cols., 2009). En la molienda las fuerzas de compresión y cizallamiento rompen las cadenas de

estos polisacáridos, como sucede en el refinado para la elaboración del papel (Hubbe y cols., 2007).

Como se mencionó anteriormente, la nixtamalización influye en gran parte sobre la composición proximal de la masa; en relación a la molienda los cambios ocasionados dependerán del proceso que se haya seguido, el tradicional o el industrial (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3:** Composición química de maíz crudo y de masa nixtamalizada (g/ 100g de maíz) (Mora-Escobedo y cols., 2009).

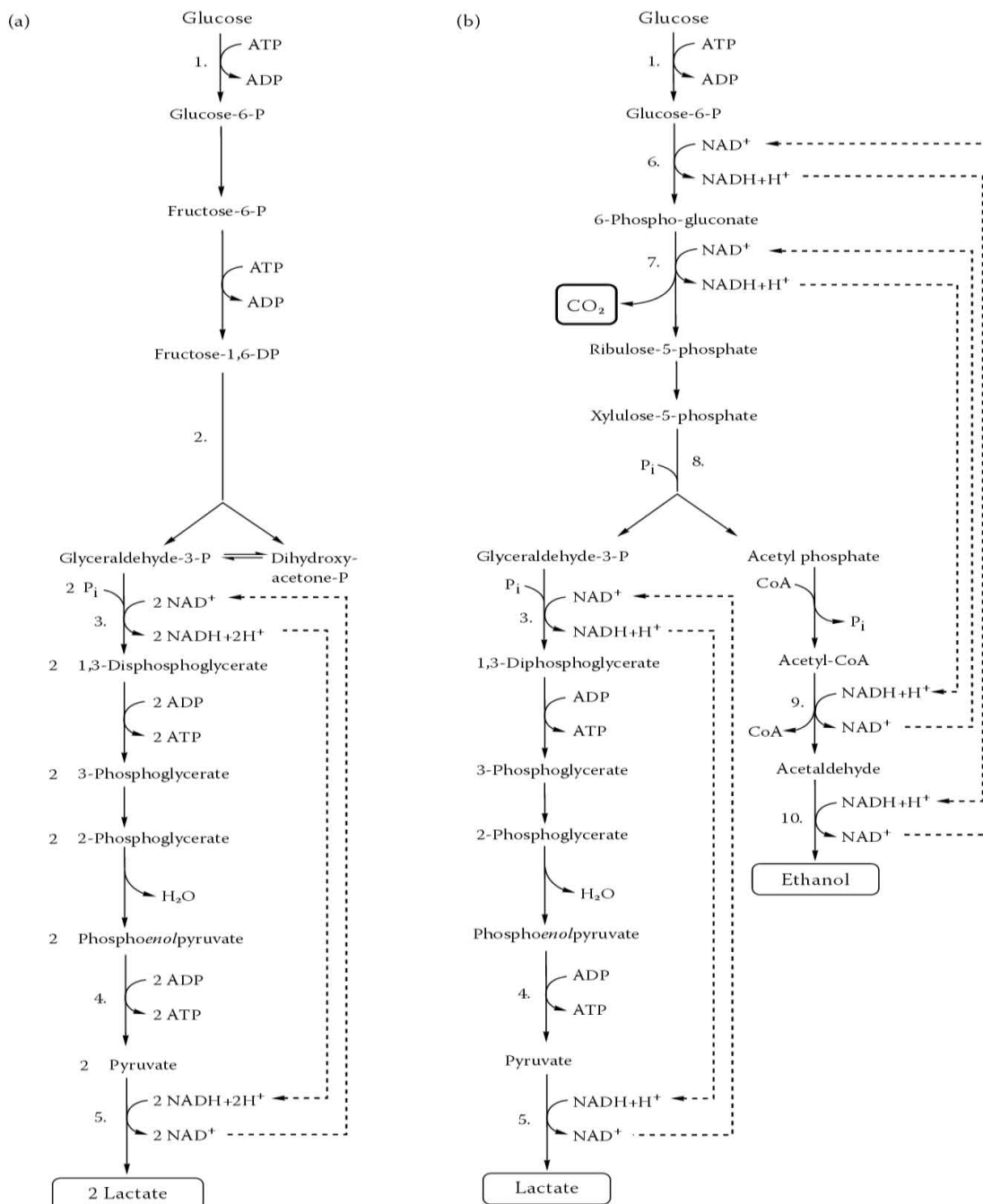
	<b>Proteína</b>	<b>Extracto etéreo</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Almidón digerible</b>	<b>Almidón resistente</b>
<b>Maíz crudo</b>	10.0	6.4	2.1	89.3	-
<b>Masa nixtamalizada</b>	8.8	3.4	3.4	87.6	0.4

	<b>Fibra soluble</b>	<b>Fibra insoluble</b>	<b>Fibra Total</b>
<b>Maíz crudo</b>	1.2	8.6	9.8
<b>Masa nixtamalizada</b>	1.0	8.3	9.3

#### 2.2.2.4 Fermentación

La fermentación es el proceso metabólico en el que los carbohidratos y compuestos afines son oxidados, con liberación de energía, en el cual los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente por escisión de los carbohidratos, con una oxidación parcial del compuesto original. En la degradación enzimática de los carbohidratos, el ATP se sintetiza por fosforilación a nivel sustrato y ocurre en ausencia de oxígeno (pero a veces tiene lugar en su presencia). La fermentación láctica comienza por la glucólisis y produce ácido láctico para reoxidar el NADH para que continúe el proceso de la glucólisis. Los microorganismos poseen la capacidad de fermentar diversos sustratos y los productos finales dependen del tipo de microorganismo y del tipo de sustrato. Las bacterias ácido lácticas como organismos fermentadores carecen de sistemas funcionales de

transporte de electrones ligados al grupo hemo o a citocromos, por lo que obtienen su energía por fosforilación oxidativa a nivel sustrato mientras oxidan los carbohidratos (Dendy y Dobraszcyk, 2004; Tortora y cols., 2007).



**Figura 2.6:** Vías de fermentación láctica; a) homoláctica, b) heteroláctica (Lahtinen y cols., 2011).

Algunos aportes del proceso de fermentación del maíz: (Othón, 2001; García y cols., 2010; Casanova-Ortiz y González-Olivares, 2016; Wachter, 2014).

- Las enzimas degradan los componentes del grano.
- Baja el pH y por lo tanto ayuda al control de microorganismos patógenos.
- Aumenta la cantidad de proteínas solubles y aminoácidos libres, por lo que mejora la calidad proteica debido a la mejor disponibilidad de los aminoácidos principalmente la lisina.
- Se incrementa el aporte energético al aumentar la digestibilidad del almidón.
- También se ha encontrado que el contenido de tiamina y riboflavina se ve aumentado.

### **2.2.3 Microambientes**

Los microambientes son zonas con condiciones diferentes con respecto a su entorno. Algunos ejemplos de “zonas” de la masa de pozol que se han reportado que tiene diferente composición química y pH; y que pueden influir en la presencia de “microambientes, en función de la definición anterior” son:

- Durante la nixtamalización el pH es alcalino, pero después de los lavados el pH de la masa es de neutro o ligeramente alcalino (7.40). Durante la fermentación el pH baja a valores de 4.40 (Díaz-Ruiz y cols., 2003) o hasta de 3.87 a 3.63 en el centro (donde el centro se considera como, la porción de masa situada dos milímetros por debajo de la superficie de la bola) de la masa de pozol (Ampe y cols., 1999).
- Se han reportado bajas concentraciones de mono o disacáridos, de los cuales se ha encontrado glucosa y maltosa principalmente en la periferia de la masa (Ampe y cols., 1999).
- También se han encontrado lactato, acetato, etanol y formato. El lactato es el mayor producto de la fermentación; el acetato principalmente se encuentra en la periferia, lo que indica que el lactato es usado por microorganismos en presencia de oxígeno y transformado a acetato. Por otra parte, la concentración de etanol es mayor en el centro de la masa (Ampe y cols., 1999).
- Otros estudios demuestran que los procesos son diferentes en las poblaciones mestizas e indígenas, donde el contenido de agua de  $72.3 \pm 0.6$  (m/m) en el pozol mestizo, es más alto, en comparación con la del pozol indígena, de  $51.8 \pm 0.6$  (m/m), lo que indica que la

cocción adicional favorece la absorción de agua; así como a la concentración de carbohidratos solubles, 0.7 g/100g de masa seca en el pozol indígena y 0.1 g/100g de masa seca en el pozol mestizo (Wacher y cols., 2000).

#### **2.2.4 Fuentes de inclusión de microorganismos en el pozol**

El desarrollo de la fermentación de la masa de pozol se realiza sin aplicación de inóculo como cultivo iniciador, ya que ésta es una fermentación natural. La nixtamalización es un proceso drástico, después del cual es difícil detectar microorganismos, de manera que los que participen en la fermentación deberán ser los que se introduzcan en etapas posteriores a ésta. Existen 3 fuentes principales:

a) Molienda

- La mayor fuente de inclusión en la elaboración del pozol, ocurre en la molienda, ya que los molinos utilizados poseen ciertas zonas donde queda atrapada masa de moliendas pasadas, siendo éstas parte importante de la contribución a la microbiota de este producto.

b) Elaboración de la bola de pozol

- Otra fuente importante de inóculo es en la elaboración de la bola de pozol previa a su fermentación, ya que la bola se hace de forma manual.

c) Agua empleada en el proceso

- El agua empleada en el proceso de esta bebida-alimento es otra fuente de inóculo si ésta no es higiénica (Frazier y Westhoff, 1993). El agua se usa para preparar la disolución de cal, en los lavados, en el remojo y en la elaboración de la bola de masa para hidratarla.

#### **2.2.5 Microbiología del pozol**

En el pozol ocurre una fermentación láctica y los microorganismos representativos son las BAL, las cuales tienen requerimientos nutricionales complejos, ya que necesitan para su desarrollo aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas del complejo B y fuentes de carbono (Leveau y Bouix, 2000; Madigan y cols., 2004). Degradan proteínas y las usan como fuente de nitrógeno (Tortora y cols., 2007), como por ejemplo BAL, que liberan

aminoácidos de las proteínas. Esto incrementa la calidad nutritiva del pozol (Casanova-Ortiz y González-Olivares, 2016; Wachter, 2014, García y cols., 2010).

En la mayoría de los alimentos en los que ocurre una fermentación láctica natural tienden a predominar las bacterias ácido lácticas (BAL); sin embargo, es común encontrar otro tipo de bacterias, como las enterobacterias. Éstas en general no son capaces de sobrevivir a valores bajos de pH. También se encuentran mohos y levaduras, que en general pueden desarrollarse a valores bajos de pH.

### 2.2.5.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos al que pertenecen al menos ocho géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* y se ha ampliado para incluir los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Tortora y cols., 2007; Jay, 2002; Frazier y Westhoff, 1993).

Las bacterias lácticas son Gram positivas, catalasa negativas, no forman esporas y son inmóviles. Presentan dos tipos de fermentación homoláctica u homofermentativa, cuando producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación y heteroláctica o heterofermentativa, cuando las bacterias producen lactato, acetato, dióxido de carbono y etanol (Madigan y cols., 2004; Lahtinen y cols., 2011) y en ambos casos producen ácido láctico (Kandler, 1983). Las BAL heterolácticas facultativas cuando existe un exceso de azúcares pueden usar la ruta homoláctica (Jay, 2002; Lahtinen y cols., 2011; Dellaglio y cols., 1994). Todos los representantes de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* junto con algunos lactobacilos son homofermentativos; mientras que todas las especies del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentativos.



**Figura 2.7:** Bacterias ácido lácticas en medio MRS.

### 2.2.5.2 Bacterias ácido lácticas en el pozol

Entre las bacterias BAL que destacan en el pozol (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Ampe y cols., 1999; Escalante y cols., 2001; Ben Omar y Ampe, 2000; Wachter y cols., 2000; Ulloa y cols., 1987), están:

- *Streptococcus* Son cocos Gram positivas esféricas que presentan una disposición típica en cadena y todas son homofermentativas.
- *Lactobacillus*: Son bacilos Gram positivos, catalasa-negativos, que con frecuencia se presentan en cadenas largas; los que se encuentran en alimentos son típicamente microaerófilos, algunas cepas son anaerobias estrictas, en especial en las heces de los humanos. Comercialmente se utilizan en alimentos fermentados.
- *Enterococcus*: son cocos, Gram positivos que se presentan aisladas, en pareja o en cadenas cortas, se adaptan a zonas con un alto contenido de nutrientes pero baja cantidad de oxígeno como en el tracto gastrointestinal, se consideran como indicadores de la seguridad de los alimentos y dentro de sus características están el ser más exigentes que las bacterias Gram negativas (en cuanto a sus necesidades nutricionales), tiene un crecimiento en una escala de pH más amplio, son aerobios pero no producen catalasa aunque si una pseudocatalasa producida por algunas cepas cuando crecen en presencia de oxígeno.
- *Lactococcus*: Son células esféricas u ovoides, Gram positivas y catalasa-negativos que se presentan aisladas, en parejas o formando cadenas. Son homofermentadoras.
- *Leuconostoc*: Son cocos Gram positivos, catalasa-negativos que son heterofermentativos, son productores de diacetilo, tienen capacidad de iniciar la fermentación en productos vegetales con mayor rapidez que el resto de las bacterias lácticas. Se caracterizan por producir dextrano, además de estimular el crecimiento de estreptococos lácticos. Las bacterias del género *Weissella* son Gram positivas y tienen forma esférica o bacilar irregular y están unidas a las bacterias del grupo porque ambas pertenecen a la familia Leuconostocacea. (Salminen y cols., 1998; Leveau y Bouix, 2000).

La función de éstas bacterias dentro del pozol, es degradar carbohidratos que pueden ser utilizados por ellas y como sustrato de otros microorganismos, además de generar ácidos orgánicos como el láctico que baja el pH y puede prevenir la presencia de bacterias

patógenas; además de impartir con los metabolitos generados las características sensoriales propias de este alimento.

### **2.2.5.3 Bacterias no lácticas en el pozol**

Entre las bacterias que se encuentran en el pozol y que no son ácido lácticas (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Ampe y cols., 1999; Escalante y cols., 2001; Ben Omar y Ampe, 2000; Wachter y cols., 2000; Ulloa y cols., 1987), están:

- Enterobacterias (Tortora y cols., 2007; Jay, 2002; Frazier y Westhoff, 1993): Son bacilos Gram negativos, en forma de bacilos rectos, anaerobios facultativos, habitan en el tracto intestinal de los seres humanos y otros animales. Todas son fermentadoras de la glucosa y de otros carbohidratos. Dentro del grupo de las enterobacterias hay 4 géneros que son considerados coliformes: (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*), que fermentan la lactosa con producción de gas y cuya presencia en cuentas altas indica la posible presencia de patógenos. Tienen un pH óptimo de crecimiento de 7.0 (D'Mello, 2004), pero a valores de 5.5 a 5.0 se inhibe su crecimiento (Schoreder, 2004). Su presencia en el pozol, donde predominan las BAL, que producen ácidos y otras sustancias antimicrobianas, se cree es por la existencia de microambientes o por la resistencia de algunas cepas (Wachter-Rodarte, 1995; Ampe y cols. 1999), por otra parte su presencia indica contaminación fecal, como lo reportaron Ben Omar y Ampe, (2000).

### **2.2.5.4 Microorganismos eucariontes en el pozol**

Entre los microorganismos eucariontes encontrados en el pozol (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Ampe y cols., 1999; Escalante y cols., 2001; Ben Omar y Ampe, 2000; Wachter y cols., 2000; Ulloa y cols., 1987), están:

Hongos filamentosos (mohos) (Tortora y cols., 2007; Jay, 2002; Frazier y Westhoff, 1993): Crecen en la superficie de los alimentos con un típico aspecto aterciopelado o algodonoso, son multicelulares, pueden crecer en alimentos con actividad acuosa alta o baja y crecen a temperatura óptima de 25 a 37 °C. Son aerobios y la mayoría crece en la superficie de los alimentos aunque algunos son anaerobios facultativos y se conocen algunos anaerobios.



Con respecto al pH crecen bien en un rango de 2.0 a 8.5 aunque crecen mejor en medios ácidos.

- Levaduras (Tortora y cols., 2007; Jay, 2002; Frazier y Westhoff, 1993): son hongos unicelulares con una forma esférica u oval típica; se reproducen por gemación o por fisión, en cultivos en placas de agar es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias de bacterias por lo que la observación microscópica ayuda a diferenciarlas; su temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 25 a 30 °C; por otra parte su crecimiento se ve favorecido con un pH de 4.0 a 4.5 y en medios básicos no crecen bien, además crecen mejor en aerobiosis aunque las de tipo fermentativo crecen lentamente en anaerobiosis.

### **2.2.5.5 Etapas del desarrollo de microorganismos en el pozol**

Ben Omar y Ampe (2000) propusieron, la existencia de tres etapas en el desarrollo de la microbiota del pozol:

- Primera etapa (0 a 24 h): comprende la microbiota inicial, que se caracteriza por miembros del género *Streptococcus* y *Enterococcus*; además de aerobios estrictos como especies *Exiguobacterium*.
- Segunda etapa (24 a 48 h): se caracteriza por el predominio de BAL heterofermentativos incluyendo a especies *Leuconostoc* y *Lactobacillus fermentum* los cuales alcanzan su máximo nivel a las 48 h; y enterobacterias las cuales decrecen en el centro de la masa pero aumentan en la periferia de la misma.
- Tercera etapa (48 a 96 h): decrecen BAL heterofermentativas y se desarrollan BAL homofermentativas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbruekii*. También se han reportado Bifidobacterias, las cuales no se han detectado en etapas tempranas de la fermentación del pozol.

Estudios anteriores han reportado altas concentraciones de lactato observadas en el pozol lo que indica que las BAL son los microorganismos dominantes (Ampe y cols., 1999; Blanco-Gómez y cols., 2008) y responsables de la acidificación de la masa (Sainz y cols., 2001, 2005).

En la parte externa de la masa existe una actividad importante de levaduras, mohos, bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos (incluyendo miembros del género

*Leuconostoc*), enterobacterias y otros no BAL como miembros del género *Acetobacter* (Ampe y cols., 1999).

Un dato importante es que las enterobacterias no son inhibidas por la acidificación de la masa (Wacher y cols., 2000) por lo que la presencia de estas bacterias a pesar de las altas concentraciones de lactato indica la posible existencia de microambientes o la resistencia de algunas especies como se ha demostrado por Sainz y cols. (2001, 2005).

Además la presencia de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y enterobacterias indica la presencia de microorganismos de origen fecal (Ben Omar y Ampe, 2000).

### **2.2.5.6 Bacterias representativas en el pozol**

El desarrollo de los microorganismos se ve influenciado por la disponibilidad de carbono, al principio los carbohidratos solubles sólo se encuentran en trazas por lo que es posible que la presencia de microorganismos capaces de usar el almidón e hidrolizarlo haga disponible el carbono para microorganismos no amilolíticos, por lo que esto podría explicar el aumento en la biodiversidad, además de que los productos de fermentación como lactato, etanol y formato pueden ser usados como fuente de carbono (Ben Omar y Ampe, 2000).

Las BAL contribuyen en un porcentaje de 90 a 97 % de la microbiota activa (esto se ve respaldado con el alto contenido de lactato en la masa) (Ampe y cols., 1999; Ben Omar y Ampe, 2000; Nuraida y cols., 1995); de este porcentaje del 25 al 50 % son del género *Streptococcus*; el porcentaje restante de BAL corresponde a bacterias del género *Lactobacillus* (principalmente *L. plantarum* y *L. fermentum*), juntos con miembros del género *Leuconostoc* y *Weissella*. El porcentaje no perteneciente a BAL corresponde esencialmente a la actividad de la periferia que recae principalmente en eucariontes (como mohos y levaduras), enterobacterias y bacterias productoras de exopolisacáridos (Ampe y cols., 1999). Estudios indican que las BALA son el grupo dominante ya que se encontraron durante todas las etapas de la fermentación del pozol (Díaz-Ruiz y cols. 2003; Wacher y cols., 2000). Al inicio de la fermentación del pozol el 40 % de las BAL presentes en la masa son amilolíticas (BALA) y su porcentaje decrece a 3 % después de las 72 horas, donde prevalecen las bacteria no amilolíticas que usan carbohidratos que producen las amilolíticas (Díaz-Ruiz y cols., 2003).

Entre las principales BALA encontradas en el pozol está *Streptococcus infantarius* siendo el que presenta mayor ventaja dado que tiene una velocidad de crecimiento alta en almidón en comparación con la maltosa además de presentar una elevada eficiencia de conversión de energía en biomasa a pesar de su baja eficiencia en hidrólisis de almidón y consumo total de carbohidratos (Díaz-Ruiz y cols., 2003). En el mismo trabajo se identificaron como BALA a *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

*S. infantarius* se ha detectado en estudios anteriores del pozol por DGGE, (Díaz-Ruiz y cols., 2003.) considerando las condiciones de preparación del pozol en especial la cocción alcalina en la preparación del nixtamal, se piensa que conlleva a la selección de esta bacteria con respecto a otras (Díaz-Ruiz y cols., 2003.) La mayoría de las BAL decrece cuando el pH comienza a bajar pero *S. infantarius* se ha detectado en varias etapas de la fermentación del pozol (hasta 96 horas) aun cuando el pH ha bajado (por lo que una posible explicación del porque *S. infantarius* sobrevive en el masa acidificada, es la presencia de microambientes que presenten un pH alto como el ocasionado durante el tratamiento alcalino) (Díaz-Ruiz y cols., 2003; Ampe y cols., 1999).

Otro grupo de BAL en el pozol son los lactococos y miembros del grupo de *Leuconosoc-Weissella*, éstos se desarrollan en etapas tempranas y contribuyen a la acidificación de la masa (Ampe y cols., 1999).

Entre las cepas de Lactococos que se ha documentado que se encuentran en el pozol, se hallan *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Ampe y cols., 1999).

Se ha reportado la presencia de *Leuconostoc* en la superficie como grupo dominante lo cual es posible a un pequeño aumento en el pH provocado probablemente por la presencia de levaduras en la superficie ya que éstas son capaces de usar el lactato como fuente de carbono contribuyendo consecuentemente con un aumento en el pH de la superficie de la masa (Ampe y cols., 1999).

### **2.2.5.7 Ejemplo de bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA) frecuentemente aislados de alimentos**

Las BALA pertenecen al género *Lactobacillus* y son comúnmente heterofermentativas como *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyton y cols., 1998) o heterofermentativas

facultativas como *L. plantarum* (Olimpia y cols., 1995; Nwankow y cols., 1989; Molin, 1995). Bacterias heterofermentivas estrictas se han aislado del ogi de Nigeria como *Leuconostoc mesenteroides* (Molin, 1995), *Leuconostoc sp.* del pescado silage (Díaz-Ruiz y cols., 2003) y *L. fermentum* del la masa fermentada de maíz (mawe y ogi) (Agati y cols., 1998).

Un alto número de cepas de *L. fermentum* se han aislado de masa de maíz en Ghana de mawey ogi en Benin (Agati y cols., 1998) y del pozol de México (Ampe y cols., 1999).

*L. plantarum* y *Lactobacillus pentosus* aportan un tercio de las 92 BAL aisladas del pozol según (Escalante y cols., 2001). Lo que confirma que estos microorganismos juegan un papel importante en la fermentación del pozol (Ben Omar y Ampe, 2000). Con respecto a *L. plantarum* se han hecho estudios con respecto a la cepa A6 aislada de yuca fermentada y se encontró que tiene una alta actividad amilolítica a pH 6 pero cuando la fermentación no es controlada en cuanto al grado de acidez se produce una baja cantidad de la amilasa y la hidrólisis de los gránulos de almidón es incompleta (Giraud y cols., 1994).

### **3 HIPÓTESIS**

Debido a que los procesos de nixtamalización y molienda para la elaboración del pozol conducen a la formación de diversos tamaños de partícula en la masa de pozol se asume que las fracciones tendrán una composición química diferente y como consecuencia su composición microbiológica será también diferente, variarán en cuanto a la concentración de fibra y de almidón así como en la disponibilidad de éste, y tendrá diferente pH inicial, lo cual influirá en el establecimiento de la microbiota inicial típica del pozol.

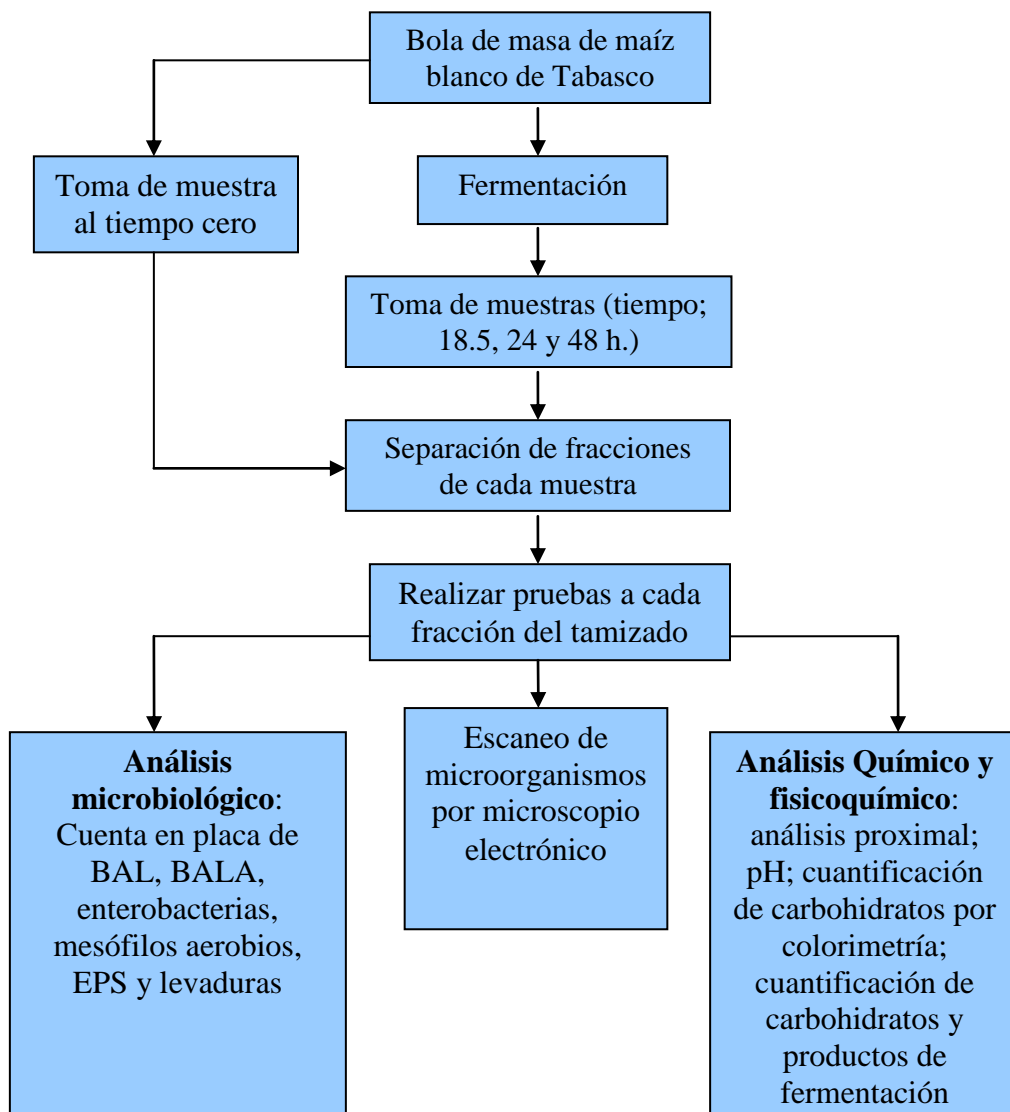
## **4 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si existen diferencias en la composición química y en el desarrollo de microorganismos en dos diferentes tamaños de partículas de masa de nixtamal y durante su fermentación.

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Establecer dos fracciones de diferentes tamaños (fina y gruesa) de la masa de nixtamal a estudiar, así como cuatro tiempos de fermentación a analizar (0 h, 18.5 h, 24 h y 48 h).
- Analizar si existe diferencia en la composición química, pH y composición microbiológica de las diferentes fracciones durante la fermentación de la masa.
- Investigar si existen diferencias en el desarrollo de cada uno de los grupos microbianos en cada fracción estudiada durante la fermentación.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 5.1:** Diagrama de flujo del procedimiento experimental.

## **5.1 PRUEBA PRELIMINAR**

Se efectuó una fermentación de prueba del pozol (0, 24 y 48 h), con el fin de determinar el método de acondicionamiento de la muestra antes de clasificarla en fracciones.

### **5.1.1 Muestreo de pozol para prueba preliminar**

El pozol se recolectó del Mercado de Atasta de la Ciudad de Villahermosa Tabaco, se compraron 15 bolas de pozol de aproximadamente 160 g cada una, para ser enviado a la Ciudad de México D.F. por vía paquetería, cada bola de pozol se empaquetó en una bolsa de plástico y se congeló.

### **5.1.2 Fermentación del pozol para prueba preliminar**

Se tomó como unidad de muestreo a la bola de pozol completa. Una vez llegado al laboratorio se tomaron 5 muestras y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las 10 muestras restantes se dejaron fermentar envueltas en hojas de plátano a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 muestras 24 h y 5 muestras 48 h), estas 10 muestras después de su fermentación se almacenaron a menos  $20^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

### **5.1.3 Separación de fracciones y elección de procedimiento**

Con el objetivo de seleccionar el mejor método de separación de fracciones de diferente tamaño de la masa, se compararon 3 formas de separar a la masa:

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente ya que estaban almacenadas a menos  $20^{\circ}\text{C}$ .

- Tamizado directo: La masa se hace pasar por el tamiz de malla No. 10 (2 milímetros) con ayuda de una espátula.
- Secado-tamizado: La masa se seca a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 h, posteriormente se hace pasar por el tamiz.
- Liofilización-tamizado: La masa se aplana en una prensa para tortillas hasta alcanzar un grosor aproximado de 0.5 centímetros, se coloca en un frasco de plástico y se almacena a



-70°C por 24 h., después la muestra se coloca en la liofilizadora durante 90 h con una presión de -20 nanómetros y se tamiza.

## **5.2 SEPARACIÓN DE FRACCIONES**

### **5.2.1 Muestreo de pozol**

El pozol se recolectó del Mercado de Atasta de la Ciudad de Villahermosa Tabasco, se compraron 12 bolas de pozol de aproximadamente 160 g cada una. Se tomó como unidad de muestreo a la bola de pozol completa.

Tres unidades de muestreo se aplanaron y guardaron en bolsas de plástico a temperatura de congelación (ya que éstas servirán como muestra control y muestra sin proceso de fermentación), las 9 muestras restantes (temperatura ambiente) se envolvieron en hojas de la planta de plátano.

Todas las unidades de muestreo fueron trasladadas inmediatamente a la Ciudad de México D.F. por vía paquetería, cada unidad de muestreo se empaquetó en una bolsa de plástico.

### **5.2.2 Fermentación de pozol**

Una vez llegado las muestras al laboratorio, seis de ellas (3 muestras 0 h (control) y 3 muestras 18.5 h) de forma independiente fueron aplanadas y puestas en frascos de plástico (previamente lavados con etanol al 96 % v/v y con 20 minutos en la campana de flujo laminar) para su congelación a -70 °C (almacenamiento en un ultracongelador (Revco Puffer Hubbard, modelo IUF7513ABA) por un día).

Las muestras restantes (6 bolas de pozol envueltas en hojas de plátano) se colocaron en la incubadora para su fermentación a 30 °C (3 muestras 24 h y 3 muestras 48 h). Después de la fermentación se separó la envoltura de hoja de plátano, se aplanaron y se almacenaron en bolsas de plástico a -20 °C para posteriores análisis.

### **5.2.3 Liofilización para separación de fracciones**

Las 3 muestras control, previamente almacenadas a -70 °C se liofilizaron en Liofilizadora

(LABCONCO, modelo LYPH.LOCK6) durante un periodo de aproximadamente 90 horas con una presión de -20 nanómetros.

A las muestra fermentadas previamente almacenadas a -20 °C, al momento de su liofilización se les realizó el mismo procedimiento que a las muestras control, de forma independiente fueron aplanadas y puestas en frascos de plástico (previamente lavados con etanol al 96 % v/v y con un tiempo de 20 minutos en la campana de flujo laminar), después se almacenaron a -70 °C durante un día. Una vez congeladas se colocaron en la liofilizadora durante un periodo aproximado de 90 horas con una presión de -20 nanómetros.

#### **5.2.4 Tamizado para separación de fracciones**

Se separaron dos fracciones, fina y gruesa, para cada tiempo de fermentación 0 h, 18.5 h, 24 h y 48 h por muestra (bola de pozol completa).

El tamizado se realizó con el tamizador (W.S. TYLER, modelo RX-812) cuyos tamices fueron previamente limpiados con una toalla mojada con agua y con cloro al 10 % m/m, después con etanol al 96 % v/v y se dejaron 20 minutos en la campana de flujo laminar.

Elección del número de malla: Se usó una de las muestras liofilizadas del tiempo cero de fermentación, ésta se colocó en el tamizador, en el cual los tamices con números de malla 10 (2 mm), 20 (850 µm), 30 (600 µm), 40 (425 µm), 50 (300 µm) y 100 (150 µm), estaban colocados en orden descendente, la muestra se colocó en el tamiz con número de malla 10 y posteriormente se dejó agitando por 10 minutos, después de este tiempo, se pesó la cantidad de muestra de cada tamiz con la finalidad de seleccionar el número de malla en el que se obtuviera una cantidad similar y representativa de fracción fina y gruesa por muestra.

Seleccionado el No. 20 de malla (850 µm) y una vez liofilizadas las muestras, se tamizaron durante 10 minutos. La muestra que quedó retenida en el tamiz se consideró como fracción gruesa y la que atravesó este tamiz se consideró como fracción fina. Posteriormente las fracciones se almacenaron de forma independiente en bolsas de plástico a temperatura ambiente, para los posteriores análisis.

## **5.3 ANÁLISIS PARA CADA UNA DE LAS FRACCIONES**

### **5.3.1 Muestreo de fracciones**

Una vez separadas las 12 muestras (triplicados de tiempo 0 h, 18.5 h, 24 h y 48 h de fermentación) en las fracciones fina y gruesa, se efectuaron los siguientes análisis en cada fracción:

### **5.3.2 Microbiología**

Se realizó una cuenta en placa, se usó caldo peptonado al 0.1 % m/v como diluyente. La primera dilución (g de muestra y mL de diluyente) se homogenizó en el Stomacher (SEWARD, modelo 400 LAB BLENDER) durante 30 segundos a velocidad media y se realizaron las diluciones decimales que se usaron para inocular los medios seleccionados. Para la cuenta en placa de bacterias se incubaron a 30°C durante 48 h, para las levaduras se incubaron por 72 h.

#### **5.3.2.1 Identificación de microorganismos presentes en el pozol**

Las condiciones de incubación empleadas para los microorganismos presentes en el pozol fueron:

- Bacterias: 30 °C de temperatura durante un periodo de 48 horas.
- Levaduras: 30 °C de temperatura durante un periodo de 72 horas.

##### **5.3.2.1.1 Bacterias ácido lácticas**

Agar MRS, desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (Laboratorios Britania, 2017).

El uso de MRS-glucosa y MRS-almidón fue para diferenciar las bacterias ácido lácticas amilolíticas de las no amilolíticas.

##### **5.3.2.1.2 Enterobacterias**

Agar VRBA (Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa) (Norma oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994).

El uso agar VRBA fue para determinar el número de enterobacterias presentes en la muestra.

### **5.3.2.1.3 Levaduras**

Agar PDA (Agar papa dextrosa) (Norma oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994).

El uso de agar PDA fue para cuantificar las levaduras presentes en la muestra.

### **5.3.2.1.4 Bacterias productoras de exopolisacaridos (EPS)**

El uso de agar EPS fue para cuantificar bacterias productoras de exopolisacaridos. Por litro contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 100 g de sacarosa, 1 g de citrato de sodio, 5 g de glucosa, 2.5 g de grenetina y 15 g de agar (Ben Omar y Ampe, 2000).

### **5.3.2.1.5 Bacterias mesófilas aerobias**

Agar PCA (Agar cuenta en placa) (Laboratorios Britania, 2017).

El uso fue para determinar el número de bacterias mesófilos aerobios.

## **5.3.3 pH**

Determinación de pH (Determinación de pH en alimentos NMX-F-317-S-1978)

Se tomó 1 gramo de cada muestra, éste se mezcló con 8 mL agua destilada ( $\text{pH} = 7$ ) y agitó en vórtex durante 20 segundos, después se dejó sedimentar durante 15 segundos, para posteriormente realizar la medición de pH.

## **5.3.4 Análisis químicos**

### **5.3.4.1 Composición proximal**

#### **5.3.4.1.1 Humedad**

Determinación de humedad (Norma oficial Mexicana NMX-Y-098-SCFI-2001)

Se tomaron entre 2 y 3 gramos por fracción y se dejaron secar durante 2 horas a una temperatura de 100 a 110°C, después de este tiempo se sacó la muestra de la estufa y se colocó en un desecador hasta que se equilibró con la temperatura ambiente y después se pesó.

#### **5.3.4.1.2 Ceniza**

Determinación de cenizas (Norma oficial Mexicana NMX-Y-093-SCFI-2003)

Se pesaron de 3 a 5 gramos por fracción en un crisol previamente pesado. Se calcinó la muestra primeramente con un mechero en la campana hasta que no se desprendieran humos y posteriormente se metió a la mufla por 2 horas a 550 °C. Se sacó la muestra, se dejó enfriar en desecador y se pesó.

#### **5.3.4.1.3 Proteína**

Determinación de proteínas (Norma oficial Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2002)

Método de kjeldahl: Se pesaron 0.5 a 1.0 gramo por fracción en un papel delgado y se introdujo en un matraz kjeldahl, se agregaron 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y perlas de vidrio; se calentó hasta que el líquido quedó transparente con una coloración azul verdosa.

Después el líquido se enfrió y se le agregaron 350 mL de agua destilada y posteriormente se colocó en el tubo de digestión (previo a esto se colocó en el equipo de destilación, la mezcla de HCl e indicador rojo de metilo al 1 % m/v), después se encendió la unidad de destilación donde se fue agregando sosa al 36 % m/v, finalizada la destilación el amoniaco desprendido se atrapó en ácido bórico y se tituló con ácido clorhídrico.

#### **5.3.4.1.4 Extracto etéreo**

Determinación de Extracto Etéreo (Norma oficial Mexicana NMX-F-615-NORMEX-2004)

Método de Soxhlet: Se pesaron 4 a 5 gramos por fracción en un papel, éste se enrolló y colocó en un cartucho de celulosa que se instaló en el extractor, después se colocó el matraz de bola (previamente pesado) conectado al refrigerante, se agregaron dos cargas de éter

etélico por el refrigerante y se calentó, una vez extraída toda la grasa se quitó el cartucho con la muestra desengrasada y se continuó calentando hasta la eliminación del éter, después se quitó el matraz y se dejó secar a 75 °C - 80 °C durante 30 minutos, posteriormente se enfrió y pesó.

#### **5.3.4.1.5 Fibra cruda**

Determinación de fibra cruda (Norma oficial Mexicana NMX-F-613-NORMEX-2003)

Se pesaron 2 gramos de muestra seca y desengrasada, se colocaron en un vaso para fibra cruda y se adicionó 28.6 gramos de fibra de cerámica preparada (60 gramos de fibra de cerámica más 800 mL de agua mezclados por un minuto en licuadora a velocidad baja), 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25 % m/v hirviendo. Se dejó hervir por 30 minutos y se filtró enjuagando con agua hirviendo, al residuo seco se colocó en un vaso, después se adicionó hidróxido de sodio al 1.25 % m/v y se dejó hervir por 30 minutos, después se filtró y se lavó con 25 mL de ácido sulfúrico al 1.25 % m/v, tres porciones de 50 mL de agua y 25 mL de alcohol. Por último se dejó secar el residuo por 2 horas a  $130 \pm 2$  °C y se pesó para posteriormente calcinar por 30 minutos a  $600 \pm 15$  °C y se pesó.

#### **5.3.4.1.6 Carbohidratos**

La concentración de carbohidratos se obtiene por diferencia con respecto al 100 % en el porcentaje al final de todo el análisis proximal.

#### **5.3.4.2 Carbohidratos solubles**

Determinación de carbohidratos solubles (reductores, totales y almidón) por métodos colorimétricos

Previo a la determinación de carbohidratos solubles y productos de fermentación, se tomó de cada una de las fracciones (fina y gruesa) por muestra (0 h, 18.5 h, 24 h y 48 h de fermentación) 0.25 gramos de pozol liofilizado, se colocó en un tubo de centrífuga, se agregaron 2.25 mL de agua destilada, después se agitó en vórtex, durante un minuto a velocidad media, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, y al final se

decantó el sobrenadante; a partir de este sobrenadante se realizaron diluciones decimales correspondientes para cada determinación.

#### **5.3.4.2.1 Carbohidratos reductores**

Determinación de carbohidratos reductores (Método ácido dinitrosalicílico “DNS”)

Para cada análisis se tomaron 0.25 mL de sobrenadante de cada muestra, después se le agregaron 0.375 mL de DNS y se calentó a baño María durante 5 minutos, finalizado el calentamiento se enfrió y agregaron 2.5 mL de agua destilada y se agitó 10 segundos en vórtex. La absorbancia se leyó a 540 nm e interpoló en la curva patrón previamente realizada con concentración de 0 a 1.0 mg/mL de glucosa utilizando como blanco agua destilada tratada bajo el mismo procedimiento.

#### **5.3.4.2.2 Carbohidratos totales**

Determinación de carbohidratos totales (Método de Fenol-sulfúrico)

Para cada análisis se realizó una dilución de 1:100 del sobrenadante, de esta dilución se tomó 0.5 mL a los cuales se le agregaron 0.5 mL de fenol y agitó en vórtex, después se agregaron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y agitó en vórtex, finalizado esto se esperó de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y leyó en espectrofotómetro a 492 nm.

Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón previamente realizada con concentraciones de glucosa de 0 a 0.1 mg/mL tomando como blanco agua destilada con el mismo procedimiento.

#### **5.3.4.2.3 Almidón soluble**

Determinación de almidón (Método de extinción del complejo almidón-yodo)

Para cada análisis se hizo una dilución del sobrenadante de 1:4, después se calentó a baño María por 1 minuto y agitó en vórtex, se tomó 0.1 mL y agregaron 2.4 mL de disolución de yodo-yoduro al 4 %, después se agitó en vórtex y leyó la absorbancia a 620 nm.

Los resultados se interpolaron en una curva patrón de almidón con concentraciones 0 a 0.5 mg/mL, utilizando como blanco agua destilada con el mismo tratamiento.

### **5.3.4.3 Productos de fermentación**

Determinación de productos de fermentación mediante HPLC (cromatógrafo de líquidos de alta eficacia).

Para cada análisis se tomó una muestra del sobrenadante sin diluir, se filtró con un papel filtro de nylon de 4.5  $\mu\text{m}$  y se tomó una muestra de aproximadamente 2 mL y se colocó en los viales para el cromatógrafo. Este cromatógrafo usó una columna Aminex HPX-87H de 300 mm x 7.8 mm y un detector IR, la temperatura empleada fue de 45 °C con un flujo de 0.6 mL/min y una fase móvil de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.004 M). Para esta determinación se usaron estándares de fructosa, glucosa, sacarosa, ácido acético y ácido láctico de concentración 5 mg/mL respectivamente.

### **5.3.4.4 Fibra (pared celular vegetal)**

Determinación de carbohidratos estructurales (García y cols., 1998)

Para este análisis se trabajó con las fracciones de las muestras previamente desengrasadas.

Para cada determinación se pesó 1 gramo de harina de pozol en un matraz de 25 mL y se le adicionó 5 mL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y 100  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa termoestable; posteriormente se incubó la mezcla a 95 °C durante 30 minutos. Y centrifugó a 4300g (7500 rpm) durante 10 minutos.

La pastilla se resuspendió en 5 mL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 7.5 y se le adicionó 2.5 mg de proteasa, posteriormente la mezcla se incubó a 60 °C por 60 minutos, después se centrifugó a 4300g (7500 rpm) por 10 minutos y el sobrenadante se eliminó.

La pastilla se lavó con agua desionizada (3 mL a 5 mL), agitando vigorosamente y se centrifugó a 4300g (7500rpm) por 10 minutos, el sobrenadante se eliminó.

La pastilla lavada se resuspendió en 5 mL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 3.0 y se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de amilogucosidasa; posteriormente se incubó la mezcla a 60 °C por 60 minutos y centrifugó a 4300 g (7500 rpm) durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó.

Finalmente, la pastilla se lavó consecutivamente con agua desionizada, acetona y metanol-cloroformo (1:1 v/v), una vez lavada se colocó en un desecador hasta peso constante.



#### **5.3.4.5 Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)**

Este análisis es de forma indirecta ya que se cuantificó la glucosa hidrolizada proveniente de la celulosa y la xilosa hidrolizada proveniente de la hemicelulosa.

Previo a la determinación con HPLC, para cada fracción de las muestras se tomó aproximadamente 0.02 g de fibra obtenida por el método enzimático, la cual se colocó en un vial al cual se le agregó 1.2 mL de buffer de citratos a pH 5, 50  $\mu$ L de xilanasas y 50  $\mu$ L de celulasa, esta mezcla se tapó y se incubó a 50 °C con agitación constante durante 48 horas, después de este periodo se filtraron las muestras con un filtro de nylon de 2.5  $\mu$ m y se colocaron en viales aproximadamente de 2 mL para su lectura en el HPLC, para esta determinación se usaron estándares de xilosa y glucosa, de concentración de 1, 3 y 5 mg/mL respectivamente.

La determinación y cuantificación de glucosa y xilosa se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), acoplado a un detector de dispersión de luz (HPLC-PR-ELSD). Se usó una columna Luna NH2 (5  $\mu$ m, 100 Å, 250  $\times$  4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) y un gradiente de acetonitrilo-agua (85:15-65:35) por una hora a un flujo de 1 mL/min a una temperatura de 40 °C para llevar a cabo la separación de los carbohidratos. Las condiciones del detector fueron 100 °C en el evaporador y 70 °C en el nebulizador, el flujo de nitrógeno usado fue de 0.8 mL/min.

#### **5.3.5 Estudio de microscopia electrónica de barrido**

Para este análisis se tomó una porción de cada una de las fracciones de las muestras y se llenó aproximadamente la mitad de un tubo eppendorf, se le agregó 1 mL de glutaraldehído al 3 % m/v, se centrifugó a 3000 rps por 5 minutos y se dejó sedimentar por 2 horas a 4 °C. Después de este tiempo se decantó el sobrenadante y se lavó la muestra 3 veces con buffer de fosfatos de pH 7.4 esperando 15, 30 y 60 minutos respectivamente para cada lavado y centrifugando a 3000 rps por 5 minutos entre cada lavado. Después de esto se lavó con etanol, se esperó 10 minutos y centrifugó, primero dos veces con etanol al 30 % v/v, luego al 50 %, 70 % y 100 % con éste último se lavó 3 veces. Después de esto se secó la muestra a punto crítico y se observó en microscopio electrónico (JEOL, modelo JSM-5900LV).

## **5.4 Análisis estadístico**

Con los resultados obtenidos para cada fracción en cada uno de los tiempos de fermentación analizados, se realizó un análisis de varianza para saber si los valores presentaron diferencias significativas, altamente significativas o no presentaron diferencia estadísticamente significativo. Para los valores que presentaron diferencia se realizó una prueba de rango múltiple de Duncan, se identificó que valores presentaron diferencia, donde para su interpretación se indicó con una letra diferente, si se presentaba esta diferencia. Cuando el análisis de varianza indicaba interacción entre tiempo de fermentación (0, 18.5, 24 y 48 h) y tipo de fracción (fina, gruesa) no se debe interpretar las variables de forma independiente por lo que la prueba de Duncan se realizó en la interacción de tiempo por tipo.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS Statistics 17.0

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Prueba preliminar

Se probaron 3 métodos para separar en fracciones de diferente tamaño las muestras de la masa:

- Tamizado directo de las muestras
- Tamizado después del secado de las muestras
- Tamizado después de la liofilización de las muestras

El tamizado de la masa húmeda no fue conveniente, ya que era necesario forzar el paso de la masa a través del tamiz, el de secado tampoco, ya que la masa adquiere una textura diferente (se forman cúmulos grandes de masa), imposible de tamizar. La liofilización previa al tamizado fue el mejor método, ya que no presentó los inconvenientes antes mencionados.

Se seleccionó la liofilización para tratar las muestras de masa antes de su fraccionamiento, Para determinar el número de fracciones en las que se dividiría la muestra, se trabajó con una masa con un tiempo de fermentación de 0 h y se tamizó usando las mallas No. 10, 20, 30, 40, 50 y 100. En el Cuadro 6.1 se puede observar que con excepción de la malla No. 20, en la cual se separó la muestra en dos partes similares, se obtuvieron fracciones muy pequeñas, que no serían suficientes para realizar todos los análisis, por lo que se utilizó la malla No. 20 (850  $\mu\text{m}$ ) para fraccionar la masa previamente liofilizada. La fracción que se queda en el tamiz con la malla No. 20 se nombró fracción gruesa y la porción de masa que atravesaba esta malla se le nombró fracción fina.

**Cuadro 6.1:** Porcentaje (m/m) de muestra liofilizada, retenida al ser tamizada por diferente No. de malla

Tipo de fracción	Gruesa		Fina				
	No. de malla	10	20	30	40	50	100
Porcentaje de muestra que se retiene en cada tamiz		13.1	55.5	26.7	0.8	2.7	1.2

Posteriormente se estableció estudiar 4 tiempos de fermentación que incluyen un tiempo de 48 horas, por lo que se realizó un estudio para comprobar si la similitud en cantidad prevalecía para la fracción fina y gruesa. Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro 6.2 y cuadro 10.4.1

**Cuadro 6.2:** Porcentaje (m/m) de cada fracción, fina y gruesa, obtenido al tamizar la muestra liofilizada por la malla No. 20

<b>Tiempo</b>	<b>0 h</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Fracción</b>	Fina	Gruesa	Fina	Gruesa	Fina	Gruesa
Promedio ± Desv. Std.	63.6 ± 3.4b	36.4 ± 3.4a	66.0 ± 2.4b	34.0 ± 2.4a	65.1 ± 3.1b	34.9 ± 3.1a

El porcentaje de fracción fina y gruesa por tiempo de fermentación no presentó diferencia significativa por lo que se confirma el uso de malla No. 20 para la separación de fracciones. Se estudiaron cuatro tiempos de fermentación: 0, 18.5, 24 y 48 h de fermentación. La primera muestra fermentada, que fue enviada de Villahermosa Tabasco, se recibió a las 18.5 horas después de haber iniciado la fermentación. El tiempo cero de fermentación (el control de la masa no fermentada) se había enviado congelada.

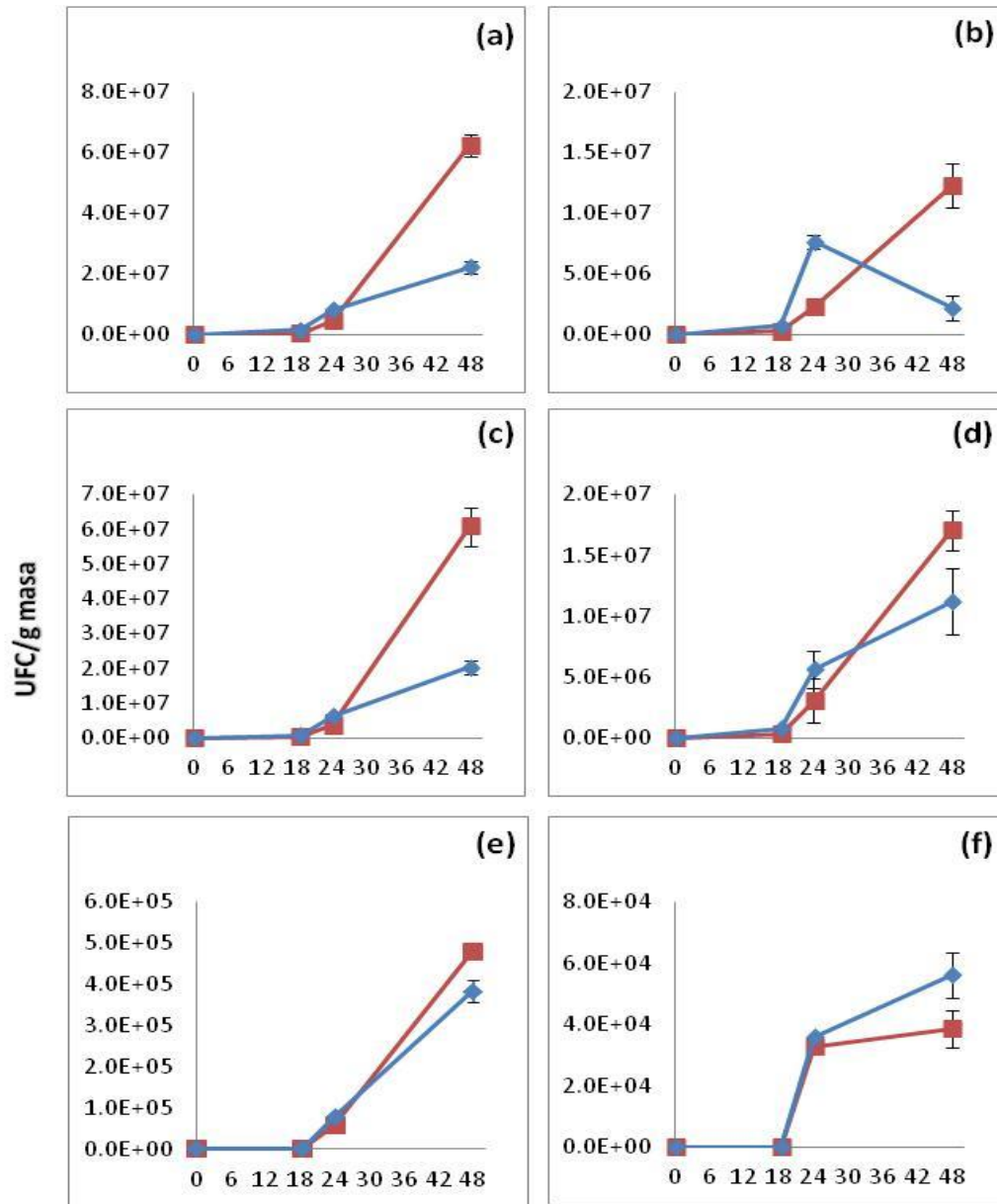
Una vez seleccionado el método de separación de fracciones, el número de malla para separar estas fracciones (fina y gruesa) y los tiempos de fermentación a estudiar, se le aplicó a todas las muestras el mismo procedimiento. Las fracciones liofilizadas y tamizadas se almacenaron en bolsas de plástico bien cerradas a temperatura ambiente hasta los posteriores análisis.

## **6.3 Análisis de fracciones**

### **6.3.2 Microbiología**

En ambas fracciones (fina y gruesa) se observaron cambios durante el tiempo de fermentación. La mayoría de los microorganismos aumentaron su cuenta al inicio de la fermentación (0 a 18.5 h), pero sin presentar diferencia significativa. Los grupos de mesófilos aerobios, EPS, BAL y BALA presentaron una mayor cuenta con diferencia

significativa en la fracción fina del tiempo 18.5 a 24 h y del tiempo 24 a 48 h en la fracción gruesa. En ambas fracciones, de las cero a las 18.5 h no se detectaron las enterobacterias (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1).



**Figura 6.1:** Cuenta de microorganismos (UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron entre (3.5E+06 y 1.6E+03) para mesófilos aerobios, entre (1.8E+06 y 3.1E+03) para EPS, entre (5.5E+06 y 1.0E+03) para BAL, entre (1.7E+06 y 5.9E+02) para BALA, entre (1.6E+04 y 7.9E+00) para levaduras y entre (7.5E+03 y 0.0E+00) para enterobacterias.

Se observaron diferencias en los resultados del estudio microbiológico entre las fracciones. De las 18.5 a 24 h, en la fracción fina se presentó una mayor cuenta de mesófilos aerobios, EPS, BAL y BALA, en comparación con la fracción gruesa. De la 24 a 48 h, se observó una mayor cuenta de estos microorganismos, así como de levaduras, en la fracción gruesa en comparación con la fracción fina.

Dentro del proceso de fermentación del pozol, la masa se transforma por acción de los microorganismos, los cuales crecen usando los componentes disponibles (Wacher, 2014). Los estudios microbiológicos demuestran que las BAL son el grupo dominante (Wacher y cols., 2000). También se encuentran levaduras, hongos y bacterias no lácticas (Ampe y cols., 1999).

La mayoría de los microorganismos aumentaron sus cuentas desde las cero horas de fermentación, pero este aumento fue significativo hasta el tiempo 18.5 h para ambas fracciones.

Las tendencias de crecimiento de los grupos de mesófilos aerobios, EPS, BAL y BALA fueron similares durante la fermentación, como se observa en la figura 6.1 y en el cuadro 10.1.1. La mayoría de EPS, BAL y BALA pertenecen al grupo de mesófilos aerobios.

Las bacterias lácticas crecieron mejor en la fracción fina en el periodo de 18 a 24 h, lo cual se debió a que en esta fracción el porcentaje de carbohidratos disponibles es mayor y el de fibra menor (Figura 6.3 y Cuadro 10.3.1.1).

Durante el proceso de elaboración del nixtamal, después de la molienda se obtiene una masa con diversos tamaños de partículas, una fracción fina de menor tamaño y una gruesa de mayor tamaño. En esta (fracción fina) existe una mayor superficie, como lo demostraron Vasanthan y Bhathy (1996). Estos autores estudiaron la hidrólisis de diferentes muestras de almidón de cebada, las expusieron al ataque enzimático con  $\alpha$ -amilasa y en el almidón de cebada, que contenía la mayor proporción de gránulos pequeños, la velocidad de hidrólisis fue mayor. Durante el proceso de molienda se liberan los gránulos de almidón de la matriz proteica del endospermo, y éstos tienen una mayor superficie para el ataque enzimático (Lamadrid-Avenida y cols., 2009). Entonces este proceso facilita la hidrólisis del almidón por las BAL (Witzig y cols., 2010), que provee carbohidratos fermentables para otros microorganismos, lo cual se refleja en la mayor cuenta con respecto a la fracción gruesa.

De las 24 a las 48 h de fermentación los microorganismos presentaron una mayor cuenta (con diferencia significativa) en la fracción gruesa, con excepción de las enterobacterias. Es posible que esto se deba al desarrollo de biopelículas, con las cuales se facilita la adherencia a las partículas. Muchos microorganismos producen polisacáridos, que son excretados al medio o quedan adheridos en forma de cápsula, estos polisacáridos extracelulares, exopolisacáridos o exopolímeros, localizados en la superficie externa de las células microbianas son de diversa composición química y propiedades físicas (Wingender y Flemming, 2012). Dentro de los microorganismos que producen biopelículas se encuentran las BAL que tienen la capacidad sintetizar polisacáridos extracelulares (Ruas-Madiedo y cols., 2002), como algunas que se han encontrado en el pozol: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbruckii* (Wilches, 2005), *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, (Aznar y cols., 2017; Nácher-Vázquez y cols., 2017) *Ln. citreum* (Wacher, 2014). Entre las enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* (Mengistu y cols., 1994), además de bacterias no lácticas como *Bacillus subtilis* (Navia y cols., 2010) y la mayoría de las levaduras, que tienen la capacidad de producir exopolisacáridos (Kurtzman y cols., 2011).

Se forman biopelículas durante el crecimiento de los microorganismos productores de exopolisacáridos. Éstas pueden provenir de una o de varias especies (Navia y cols., 2010). Se unen a los sustratos sólidos, como la superficie de los gránulos de almidón, retienen agua y forman una capa viscosa. En el pozol esta capa se forma en la superficie del pozol cuando se deja fermentar por varios días, y es indeseable para los consumidores de pozol en Chiapas (Ampe y cols., 1999).

Por otra parte, es posible que la mayor cuenta de microorganismos en la fracción gruesa de 24 a 48 h se deba a la presencia de microorganismos capaces de degradar carbohidratos estructurales, por lo que existen carbohidratos solubles disponibles provenientes de la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa. (Figura 6.7 y Cuadro 10.3.5.1).

Las cuentas de los microorganismos analizados fueron aumentando a lo largo de la fermentación. El único grupo que presentó un descenso fue EPS en la fracción fina al final de la fermentación (24 a 48 h).

Las EPS, como *Leuconostoc*, que pertenecen al grupo BAL heterofermentativo, inician la fermentación pero debido a que no son resistentes a valores de pH bajos, no sobreviven

hasta el final de la misma fermentación (Ampe y col., 1999). Debido a esto se observó un descenso a partir de las 24 h de fermentación en la fracción fina, cuando el valor de pH fue de  $5.19 \pm 0.0$  a  $4.93 \pm 0.03$  (Figura 6.2 y Cuadro 10.2.1). La causa de esto también puede ser que existen interacciones entre los microorganismos, como competencia por los nutrientes y antagonismos.

En ambas fracciones las enterobacterias se detectaron a partir de las 24 h. Este grupo de bacterias fermenta carbohidratos, y su desarrollo durante la fermentación y hasta el final de la misma se debe a su resistencia a los valores de pH del pozol, como *Escherichia coli* (Sainz y cols., 2001, 2005) o a la competencia con los demás microorganismos por la fuente de carbono. En este trabajo al inicio de la fermentación se tiene valores de pH cercanos a la neutralidad (Cuadro 10.2.1) y en el transcurso de los tiempos analizados de la fermentación no se llegó a pH de 4.5 en el cual las enterobacterias no deben sobrevivir, sin embargo Sainz y cols., encontraron que existen cepas de *E. coli* capaces de resistir estos valores de pH, esto explicaría la presencia de enterobacterias al final de la fermentación. Las BAL son conocidas por producir durante su crecimiento sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, estas sustancias antimicrobianas son metabolitos excretados por las bacterias, como el ácido láctico que disminuye el pH (Leveau y Bouix, 2000). La detección de enterobacterias en este producto puede deberse a la presencia de EPS, ya que este grupo puede formar biopelículas que generan microambientes que las protegen contra agentes antimicrobianos, por lo que éstas se protegen dentro de las biopelículas (Navia y cols., 2010). Conjuntamente las levaduras al degradar el ácido láctico, aumentan el pH a su alrededor, formando microambientes que permiten el desarrollo de las enterobacterias (Ben Omar y Ampe, 2000; Ampe y cols, 1999). También, se puede deber a la presencia de nichos con un pH mayor dado que existen iones de calcio provenientes de la nixtamalización, los cuales pueden neutralizar el ácido formado, ya que el pH de la masa está en función de la concentración de cal y del número de lavados del nixtamal (Bello-Pérez y cols., 2002). Por otra parte, no se presentaron incrementos significativos en la cuenta de enterobacterias en la fracción gruesa del tiempo 24 a 48 h, debido a la presencia de ácidos, principalmente el láctico.

Las levaduras son un grupo de microorganismos que se desarrollan bien a un pH entre 4.5 y 6.5 (Villamil y Zapata, 1999). Algunas, como varias especies del género *Candida* o



*Saccharomyces cerevisiae*, presentes en el pozol tienen la capacidad de producir exopolisacáridos, lo que les permite adherirse a superficies (Kurtzman, 2011) y formar biopelículas que las protegen contra microorganismos y les sirven para capturar nutrientes (Navia y cols., 2010), además de formar asociaciones con otros microorganismos, como reportaron (Aznar y cols., 2017) que se asocian con lactobacilos en salmueras. Las levaduras son aerobias facultativas, por lo que en presencia de oxígeno, crecen eficientemente a partir de carbohidratos como la glucosa, fructosa, disacáridos y trisacáridos como fuente de carbono (Bouix, 2000 citado por Sarmiento 2003) así como lactato (Ampe y cols., 1999; Ben Omar y Ampe, 2000) para producir biomasa, CO<sub>2</sub> y ATP; sin embargo en ausencia de oxígeno o en menor concentración de éste, producen etanol y una concentración menor de biomasa (Sarmiento y Herrera, 2003). En el pozol existe oxígeno, lo cual se puede asegurar, ya que del pozol se han aislado microorganismos aerobios estrictos, como especies de *Exiguobacterium*. En el proceso de elaboración del pozol queda oxígeno atrapado en las partículas finas y gruesas al momento de compactar la masa (Jiménez y Moreno, 2000) para formar la bola de pozol.

Se observó un aumento en las cuentas de levaduras (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1) en ambas fracciones. Las levaduras consumen ácido láctico producido por las BAL, y se crean microambientes con un pH que permite el crecimiento de enterobacterias. Para establecerse en este producto, pudieron aprovechar el descenso de pH ocasionado por el crecimiento de las BAL (grupo representativo de este producto) creando microambientes con condiciones de pH, oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno diferentes al ambiente donde se encuentran (Vital-López y Larralde-Corona, 2016), lo cual permite que se desarrollen, aún cuando las condiciones sean adversas (Betancourth y cols., 2004).

Comparando este trabajo con el que realizaron Ben Omar y Ampe en 2000 (ya que éste es uno de los principales trabajos referente al tema), en el cual estudiaron la fermentación de la parte central y la periferia de bolas de masa envueltas en hojas de plátano, se observa que obtuvieron una cuenta de bacterias mayor a la presentada en este trabajo (fracción fina y fracción gruesa). La cuenta de microorganismos mesófilos aerobios (Log<sub>10</sub> 9 UFC/g de masa) fue mayor en comparación con la que se obtuvo en la fracción fina (Log<sub>10</sub> 4.5 ± 3.6 UFC/g de masa) y en la fracción gruesa (Log<sub>10</sub> 4.4 ± 3.2 UFC/g de masa). Se obtuvieron cuentas de EPS (Log<sub>10</sub> 7 UFC/g de masa), en comparación con (Log<sub>10</sub> 4.5 ± 3.4 UFC/g de

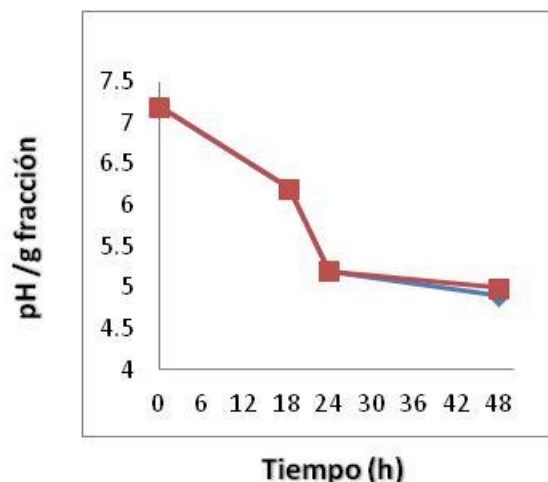
masa) en la fracción fina y con ( $\text{Log}_{10} 4.4 \pm 3.5$  UFC/g de masa) en la gruesa. Asimismo obtuvieron cuentas de BAL y BALA (de  $\text{Log}_{10} 8$  a  $9$  UFC/g de masa), en comparación con ( $\text{Log}_{10} 3.5 \pm 3.0$  y  $3.3 \pm 2.8$  UFC/g de masa) en la fracción fina, así como ( $\text{Log}_{10} 3.5 \pm 3.0$  y  $3.4 \pm 2.7$  UFC/g de masa) en la fracción gruesa, respectivamente cuantificadas en este trabajo. Las enterobacterias también presentaron una cuenta mayor (de  $\text{Log}_{10} 5$  a  $6$  UFC/g de masa), en comparación con las expuestas en este trabajo de ( $\text{Log}_{10} 0.0 \pm 0.0$  UFC/g en masa) en ambas fracciones. Por otra parte la cuenta de levaduras en el estudio de Ampe (1999), ( $\text{Log}_{10} 3$  a  $4$  UFC/g de masa), fue similar al de este trabajo, ( $\text{Log}_{10} 3.4 \pm 2.4$  UFC/g de masa) en la fracción fina y de ( $\text{Log}_{10} 3.1 \pm 2.8$  UFC/g de masa) en la fracción gruesa.

Se sabe que la liofilización afecta a los microorganismos, daña la membrana celular, provoca la desnaturalización de proteínas; por otra existen agentes protectores que tienen una papel importante en la conservación y viabilidad de las células (Zhao y Zhang, 2005) En este estudio no se usó agentes protectores ni se reactivo en un medio selectivo a las células después de la liofilización, debido a esto, se puede pensar que la liofilización como tratamiento previo a la separación de fracciones influyó de manera negativa en la viabilidad de microorganismos, ya que las cuentas de bacterias que se obtuvieron en este trabajo fueron menores a las que reportaron Ben Omar y Ampe en 2000.

Por otra parte en el estudio de Ben Omar y Ampe, (2000), en el periodo de fermentación de 24 a 48 h, el grupo de EPS presentó un descenso en la cuenta en la porción central de la masa de pozol, además BAL y BALA tuvieron una mayor cuenta en la periferia de la masa de pozol, al comparar estos resultados con los expuestos en este trabajo, se puede pensar que la porción central de la masa de pozol tiene características similares a la fracción fina, así como la periferia de la masa de pozol, con la fracción gruesa.

### **6.3.3 pH**

Se observó en ambas fracciones un descenso de pH (con diferencia significativa) conforme avanzaba el tiempo de fermentación (Figura 6.2 y Cuadro 10.2.1).



**Figura 6.2:** Cambio de pH en las fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. El valor de desviación estándar varió entre 0.03 y 0.01.

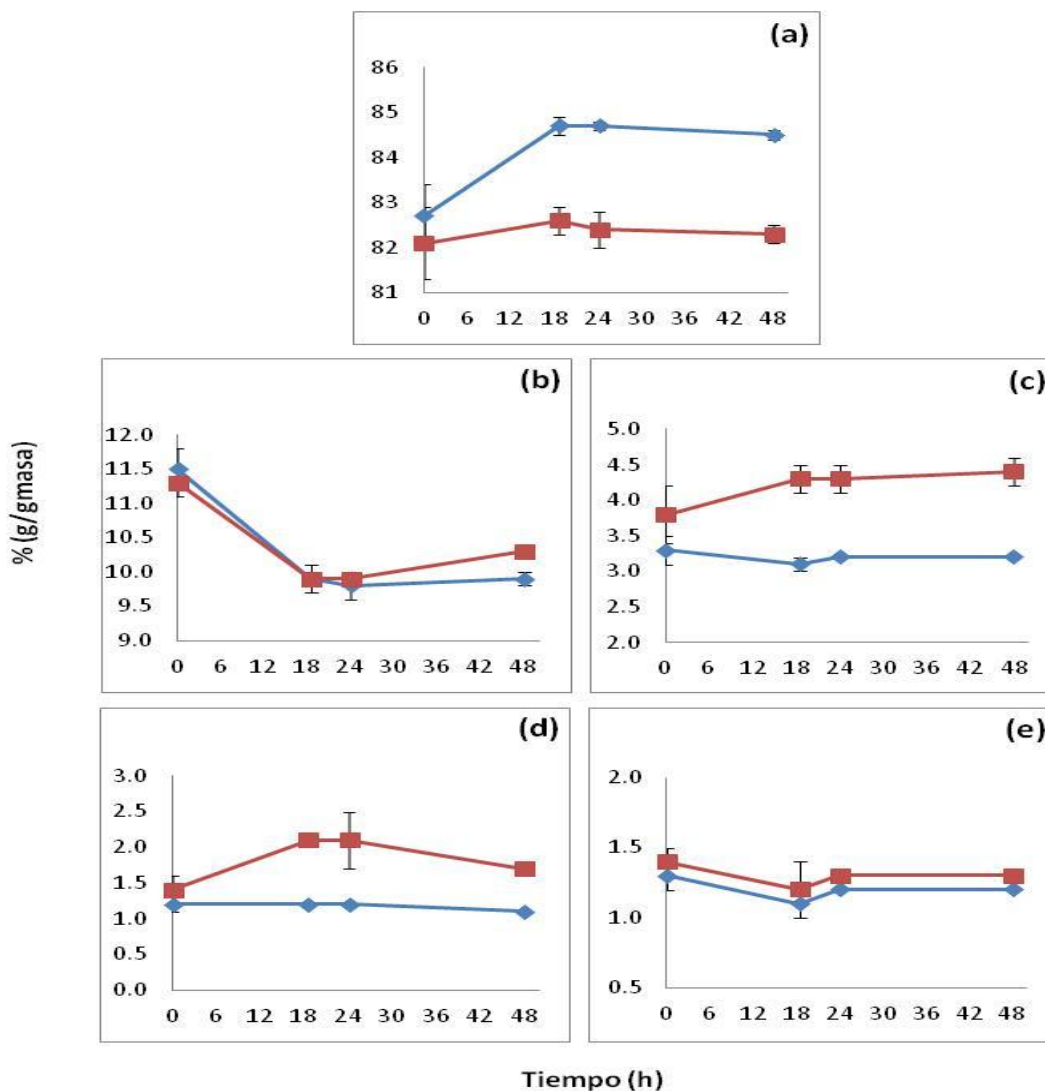
Se observaron diferencias de pH entre las fracciones. A las 18.5 y a las 48 h, se obtuvo un menor valor de pH en la fracción fina, en comparación con la fracción gruesa.

El pH disminuyó principalmente debido al crecimiento de las bacterias lácticas. El descenso fue similar en ambas fracciones, pero el valor fue menor en la fracción fina a las 18.5 h ( $6.15 \pm 0.01$  fracción fina,  $6.19 \pm 0.01$  fracción gruesa), y a las 48 h ( $4.93 \pm 0.03$  fracción fina,  $4.98 \pm 0.02$  fracción gruesa). Lo anterior se puede justificar con las cuenta de BAL y levaduras (Figura 6.1 y Cuadro 6.3) reportadas en este trabajo; a las 18.5 h BAL fue ligeramente mayor en la fracción fina ( $8.9E+05 \pm 9.9E+04$  fracción fina,  $4.0E+05 \pm 1.0E+05$  fracción gruesa), lo cual se relaciona con el pH menor, obtenido en la fracción fina, en comparación con la fracción gruesa. A las 48 h, BAL fue mayor en la fracción gruesa ( $2.0E+07 \pm 2.1E+06$  fracción fina,  $6.1E+07 \pm 5.5E+06$  fracción gruesa), pero también las levaduras se encontraron con cuentas mayores en la fracción gruesa en comparación con la fracción fina ( $3.8E+05 \pm 2.7E+04$  fracción fina,  $4.8E+05 \pm 1.6E+04$  fracción gruesa), lo cual pudo ocasionar que el lactato generado por BAL, fuera a la vez degradado por las levaduras (Ampe y cols., 1999), ocasionando un menor porcentaje de ácido láctico en la fracción gruesa (láctico  $1.3 \pm 0.0$  % m/m, fracción fina y  $1.1 \pm 0.1$  % m/m, fracción gruesa) y por lo tanto un pH mayor en esta fracción.

## 6.3.4 Análisis químicos

### 6.3.4.1 Composición proximal

Los porcentajes de grasa, ceniza y fibra fueron mayores (con diferencia significativa) en la fracción gruesa; los carbohidratos se encontraron en mayor porcentaje en la fracción fina y la proteína no presentó cambio significativo entre las fracciones (Figura 6.3 y Cuadro 10.3.1.1).



**Figura 6.3** Porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina  $\blacklozenge$  y gruesa  $\blacksquare$  de las masas de pozzol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron entre 0.1 y 0.8 para carbohidratos, entre 0.1 y 0.7 para proteína, entre 0.0 y 0.4 para grasa, entre 0.0 y 0.4 para fibra cruda y de 0.1 para ceniza.

Se observaron diferencias en los componentes del análisis proximal entre las fracciones. De las cero a las 18.5 h, en la fracción gruesa se presentó un aumento en el porcentaje de grasa y fibra cruda, mientras que en la fracción fina se observó un aumento en el porcentaje de carbohidratos. De las 24 a 48 h en la fracción gruesa se presentó un descenso en el porcentaje de fibra.

Se observó que los porcentajes de grasa, de ceniza y de fibra fueron mayores en la fracción gruesa. En el proceso de nixtamalización de maíz para elaborar la masa de pozol se generan diversos tamaños de partícula. Los fragmentos con mayor tamaño incluyen el germen (con alto contenido de grasa) y el pericarpio (que tiene alto contenido de fibra) y el contenido de calcio aumenta. Los carbohidratos se encontraron en mayor porcentaje en la fracción fina, lo cual se puede deber a que en esta fracción se encuentra el endospermo (Othón, 2001; Pflugfelder y cols., 1988).

El descenso en los porcentajes de cenizas y de proteína en ambas fracciones al inicio de la fermentación (0 a 18.5 h) coincide con el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1).

Las bacterias lácticas consumen los nutrimentos del pozol, requieren minerales para sus actividades metabólicas, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mn}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{2+}$ , que son cofactores de numerosas enzimas (Tortora y cols., 2007; Desmazeaud, 2000). Se ha reportado que el papel del calcio en la pared celular está relacionado con la actividad de las proteasas. El lactato formado se excreta de la célula mediante una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Desmazeaud, 2000; Konings y Otto, 1983). Las  $\alpha$ -amilasas son dependientes de calcio y no son funcionales en ausencia de este ión.

La disminución en el porcentaje de proteína al inicio de la fermentación se debe a que los microorganismos la consumen. Las BAL, que predominan en la fermentación producen proteasas y liberan aminoácidos y los que no consumen quedan en el alimento e incrementan su calidad nutritiva (Casanova-Ortiz y González-Olivares, 2016; García y cols., 2010; Wachter, 2014).

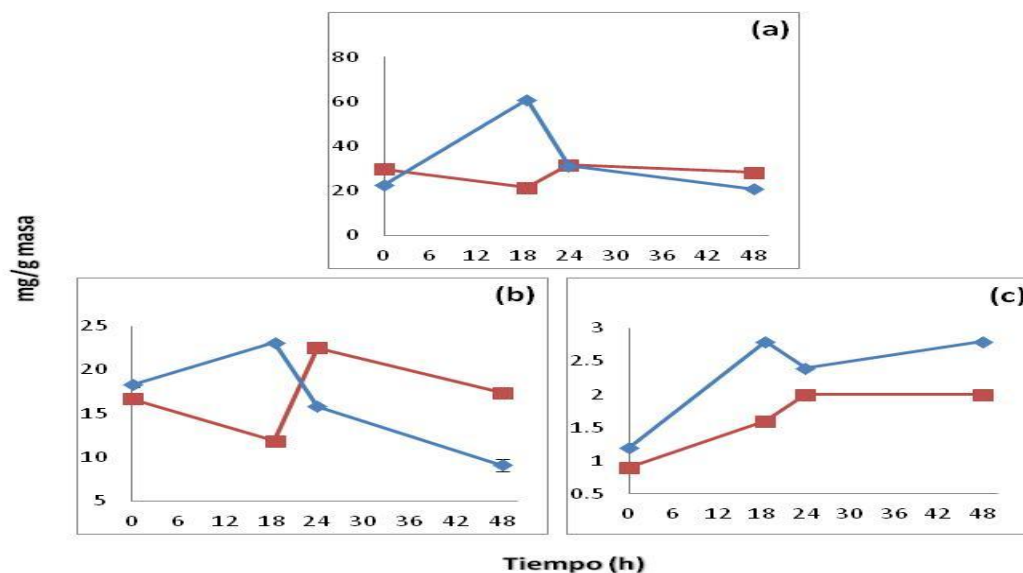
Los incrementos, de las 0 a las 18.5 h, en los porcentajes de fibra y de grasa en la fracción gruesa se deben a que se liberan en el proceso de fermentación en la masa (Figura 6.3 y Cuadro 10.3.1.1).

De las 24 a las 48 h se observó en la fracción gruesa un descenso en el porcentaje de fibra, (de  $2.1 \pm 0.4$  a  $1.7 \pm 0.0$  % m/m), lo cual se relaciona con el descenso en la concentración hemicelulosa y celulosa en esta fracción desde las 18.5 h (Figura 6.7 y Cuadro 10.3.5.1), ya que los microorganismos consumen los carbohidratos que generan por acción de sus enzimas.

El aumento con diferencia significativa en el porcentaje carbohidratos (de  $82.7 \pm 0.7$  a  $84.7 \pm 0.2$  % m/m) de 0 a 18.5 h puede relacionarse con la liberación de éstos, como se indicó anteriormente.

### 6.3.4.2 Carbohidratos solubles

La tendencia en la concentración de carbohidratos totales, reductores y almidón soluble, fue diferente para la fracción fina en comparación con la fracción gruesa. En la fracción fina se presentó una concentración mayor, con diferencia significativa, de carbohidratos reductores en comparación con la fracción gruesa. Esta tendencia se observó para el almidón, sólo en las primeras horas de fermentación (de las cero a las 18.5 h) y para los carbohidratos totales, sólo a las 18.5 h (Figura 6.4 y Cuadro 10.3.2.1).



**Figura 6.4:** Concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozoil en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron 0.5 y 0.1 para carbohidratos totales, entre 0.7 y 0.0 para almidón y de 0.0 para carbohidratos reductores.

Se observaron diferencias en la composición de las fracciones. De las cero a las 24 h, las concentraciones de carbohidratos totales y de almidón soluble presentaron una tendencia opuesta, de las 0 a las 18.5 h en la fracción fina se presentó un aumento y en la fracción gruesa un descenso en la concentración y de las 18.5 a 24 h en la fracción fina se presentó un descenso en la concentración y en la fracción gruesa un aumento. Con respecto a los carbohidratos reductores solubles, de las 18.5 a 24 h en la fracción fina se observó un descenso en la concentración y la fracción gruesa se observó un aumento, de las 24 a 48 h en la fracción fina se presentó un aumento en la concentración y la fracción gruesa permaneció sin cambio.

En el maíz la mayor concentración de carbohidratos solubles, la glucosa, la fructosa y la sacarosa se encuentran en el germen y corresponden a un 2 % en base seca con respecto al maíz (Othón, 2001). Éstos disminuyen con los procesos de nixtamalización, como se ha reportado en estudios sobre el pozol (Ben Omar y Ampe, 2000; Ampe y cols., 1999), en el cual no encontraron fructosa ni sacarosa. Por otra parte, la concentración de los carbohidratos solubles reductores (la maltosa y la glucosa) aumentan en la masa de pozol cuando los microorganismos hidrolizan el almidón. En la fracción fina, al inicio de la fermentación (0 a 18.5 h), aumenta la concentración de los carbohidratos totales, reductores y de almidón soluble (de  $22.8 \pm 0.2$  a  $60.9 \pm 0.1$  mg/g de masa), (de  $18.3 \pm 0.3$  a  $23.1 \pm 0.1$  mg/g de masa) y (de  $1.2 \pm 0.0$  a  $2.8 \pm 0.0$  mg/g de masa) respectivamente, ya que los microorganismos presentan un incremento en sus cuentas (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1). En esta etapa existe una intensa actividad metabólica. El almidón está parcialmente solubilizado y libre de la matriz proteica, por los procesos de nixtamalización y de molienda (Agama-Acevedo y cols., 2004; Bello-Pérez y cols., 2002), lo que facilita el ataque enzimático de las BALA. Esto explicaría el aumento en la concentración de carbohidratos solubles. El posterior descenso en la concentración de carbohidratos totales, reductores y de almidón soluble, de las 18.5 a 24 h de fermentación, (de  $60.9 \pm 0.1$  a  $31.4 \pm 0.3$  mg/g de masa), (de  $23.1 \pm 0.1$  a  $15.8 \pm 0.2$  mg/g de masa) y (de  $2.8 \pm 0.0$  a  $2.4 \pm 0.0$  mg/g de masa) respectivamente y de 24 a 48 h de fermentación (de  $31.4 \pm 0.3$  a  $20.9 \pm 0.2$  mg/g de masa) y (de  $15.8 \pm 0.2$  a  $9.1 \pm 0.7$  mg/g de masa), respectivamente con excepción de los carbohidratos reductores solubles, concuerda con el desarrollo de los microorganismos ya que presentaron un aumento en sus cuentas, con excepción del grupo

de EPS de las 24 a las 48 h. Los microorganismos presentaron la mayor actividad metabólica y por lo tanto una demanda de sustratos que les proporcionen energía para su crecimiento. De las 24 a las 48 h de fermentación se observó un aumento en la concentración de carbohidratos solubles reductores (de  $2.4 \pm 0.0$  a  $2.8 \pm 0.0$  mg/g de masa), en este tiempo la cuenta de EPS en la fracción fina disminuyó (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1), lo que indica posiblemente el uso de éstos carbohidratos por EPS.

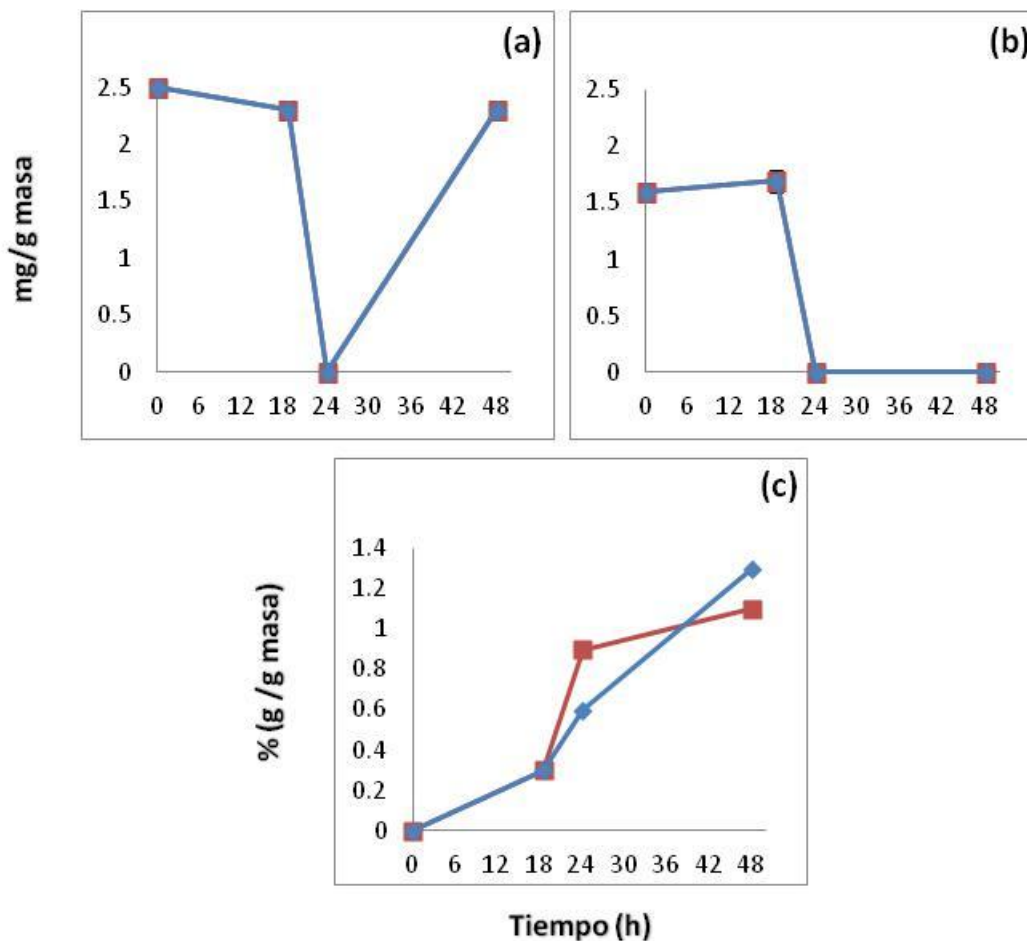
En la fracción gruesa la concentración de carbohidratos totales y de almidón soluble, desde el inicio de la fermentación hasta el tiempo 24 h, presentaron un comportamiento opuesto al de la fracción fina. Al inicio de la fermentación, cero a 18.5 h, se observó un descenso en la concentración (de  $29.8 \pm 0.2$  a  $21.6 \pm 0.5$  mg/g de masa) y (de  $16.7 \pm 0.1$  a  $11.9 \pm 0.0$  mg/g de masa) respectivamente. Esto indica que se consumieron carbohidratos solubles desde el inicio de la fermentación. Debido a la escasa disponibilidad del almidón para ser hidrolizado, ya que en la fracción gruesa se encuentra mayor concentración de fibra (Othón, 2001; Pflugfelder y cols., 1988) y el tamaño de partícula es mayor, lo que ocasiona que la superficie para el ataque enzimático sea menor (Witzig y cols., 2010,) en comparación con la fracción fina. El aumento en la concentración, de las 18.5 a 24 h, de carbohidratos totales, reductores y almidón soluble, (de  $21.6 \pm 0.5$  a  $31.8 \pm 0.4$  mg/g de masa), (de  $11.9 \pm 0.0$  a  $22.5 \pm 0.3$  mg/g de masa) y (de  $1.6 \pm 0.0$  a  $2.0 \pm 0.0$  mg/g de masa), respectivamente, se debe a la actividad metabólica, ya que a partir del tiempo 24 h, la cuenta de BALA aumenta (Figura 6.1, Cuadro 10.1.1). De las 24 a 48 h, la concentración de carbohidratos totales y de almidón soluble, disminuyeron (de  $31.8 \pm 0.4$  a  $28.3 \pm 0.3$  mg/g de masa) y (de  $22.5 \pm 0.3$  a  $17.4 \pm 0.4$  mg/g de masa), respectivamente. Esto se debe al crecimiento de los microorganismos (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1), que hidrolizan el almidón soluble. En estudios de Ampe y cols. (1999) mencionan que la degradación de éste es más fácil en comparación con la del almidón no soluble. En este periodo de fermentación, la concentración de carbohidratos reductores permaneció sin cambio, lo cual se puede relacionar con lo antes mencionado.

### **6.3.4.3 Productos de fermentación**

Los productos de fermentación analizados fueron sacarosa, fructosa, glucosa, ácido láctico y ácido acético. No se detectó sacarosa a las 24 h, así como fructosa a partir de este tiempo.



Se detectaron ácido acético y glucosa, pero en concentraciones por debajo de (0.1 mL/mL y 0.3 mg/mL; respectivamente) valores que están por debajo del rango de sensibilidad del HPLC para poder reportar una cantidad numérica en este estudio. En ambas fracciones se observó un aumento significativo en el porcentaje de ácido láctico durante la fermentación (Figura 6.5 y Cuadro 10.3.3.1).



**Figura 6.5:** Concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron entre 0.1 y 0.0 para (a), (b) y (c).

No se observaron diferencias en la concentración de sacarosa y fructosa entre las fracciones. Con respecto al ácido láctico, el porcentaje obtenido fue mayor en la fracción gruesa a las 24 h y a las 48 h fue mayor en la fracción fina.

El maíz contiene aproximadamente 2 % m/m de azúcares solubles, dentro de los cuales se encuentran glucosa, fructosa y sacarosa, que se encuentran principalmente en el germen (Othón, 2001; Wacher y cols., 2000; Chaudhary y cols., 2013; Holzapfel, 2014).

Para elaborar el pozol se hierve el maíz en agua con cal, hasta que se desprende el pericarpio. Así se obtienen los granos de nixtamal, se lavan, se remojan y posteriormente se muelen para obtener la masa, la cual se envuelve en hojas de plátano y se deja fermentar. Antes de realizar la molienda se separa el maíz del nejayote y posteriormente éste se lava con la finalidad de eliminar el pericarpio; dentro del proceso indígena de elaboración del pozol, éste es remojado una noche antes de su molienda, por lo que en el lavado del maíz existen pérdidas de nutrientes entre ellos carbohidratos solubles (Othón, 2001; Cruz-Huerta y Verdalet-Guzmán, 2007; Ruiz y cols., 2009). Esto concuerda con los estudios de Ampe y cols., 1999, así como con estudios de Ben Omar y Ampe, 2000, que encontraron bajas concentraciones de monosacáridos (glucosa) y de disacáridos (maltosa), menores a 1  $\mu\text{mol/g}$  de masa.

Los carbohidratos que usan las bacterias lácticas al inicio de la fermentación son los que permanecen en la masa después de la nixtamalización y posteriormente el que se obtiene por la hidrólisis del almidón.

La fructosa y la sacarosa presentes en la masa al inicio de la fermentación son remanentes del proceso de nixtamalización. En los resultados se observó que la concentración de sacarosa disminuyó de las cero a las 18.5 h, (de  $2.5 \pm 0.0$  a  $2.3 \pm 0.0$  mg/g de masa), lo cual indica que fue consumido por los microorganismos. Esta disminución se relaciona con el aumento en la concentración de fructosa en este mismo periodo de tiempo, de cero a 18.5 h, (de  $1.6 \pm 0.0$  a  $1.7 \pm 0.0$  mg/g de masa), debida a la hidrólisis de la sacarosa.

Después de las 18.5 h ya no se detectó la fructosa, lo cual indica su fácil asimilación por parte de los microorganismos, por otra parte la sacarosa a las 18.5 h presentó un descenso y después un aumento en la concentración. Esto se debe seguramente a que es un disacárido que algunos microorganismos pueden hidrolizar. Todas las BAL fermentan la glucosa, pero sólo algunas fermentan la sacarosa o las pentosas (Leveau y Bouix, 2000). En un estudio realizado por Díaz-Ruiz y colaboradores en el 2003, reportaron para BALA pertenecientes al género *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (*S. infantarius*, *S. macedonicus*, *Lc. lactis* y *E. sulfureus*) aisladas de pozol, eran capaces de fermentar sacarosa, maltosa,

glucosa y fructosa, que son los principales azúcares solubles del maíz. El aumento en la concentración se puede deber a la hidrólisis de carbohidratos, que pudieran estar acomplejándola y por lo tanto impidiendo su detección, por lo que al avanzar el tiempo en la fermentación y por ende en la hidrólisis enzimática de carbohidratos, ésta quedar liberada tanto para el consumo por microorganismos como para su detección.

La glucosa se detectó en ambas fracciones, pero la concentración fue menor al límite de sensibilidad del HPLC (0.3 mg/mL).

En las etapas iniciales los microorganismos usan los carbohidratos solubles, pero se encuentran en baja concentración, después de que los microorganismos los consumen, hidrolizan el almidón soluble (Ampe y cols., 1999). En este producto el principal carbohidrato es el almidón, cuya concentración se ha determinado entre 67 y 73 % del maíz (Chaudhary y cols., 2013). Se ha reportado que BAL tienen una participación importante en la fermentación del pozol, que se desarrollan desde el inicio de la fermentación y representan un 90 a 97 % de la microbiota de este alimento. Se conoce también que la mayoría de estas bacterias son amilolíticas, como *Lactobacillus fermentum*, el cual se ha encontrado en un gran número de fermentaciones de productos que contienen almidón (Agati y cols., 1998; Brauman y cols., 1996; Halm y cols., 1993; Hamad y cols., 1992) como en el uji (Bebida a base de maíz, sorgo o mijo) popular en África Oriental (Chaudhary y cols., 2013; Othón, 2001), *L. plantarum* y *Streptococcus infantarius* (Ampe y cols., 1999; Ben Omar y Ampe, 2000; Díaz-Ruiz y cols., 2003) Las BALA del pozol, hidrolizan el almidón y lo hacen disponible para su crecimiento y el de otros microorganismos (Ben Omar y Ampe, 2000).

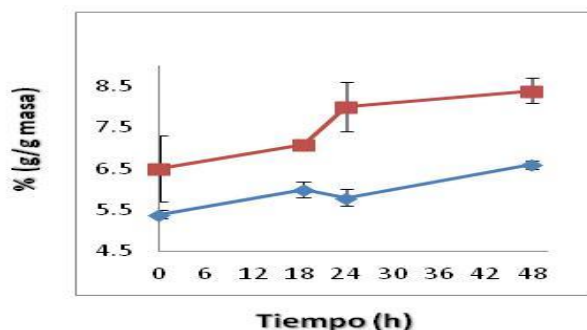
La concentración de ácido acético es muy baja (por debajo del rango de sensibilidad del HPLC, 0.1 mL/mL), esto se debe a que durante la fermentación predominan las bacterias homofermentadoras y a que dentro de la bola de nixtamal las condiciones seguramente son anaerobias (Ben Omar y Ampe, 2000) y las bacterias heterofermentadoras en ausencia de oxígeno producen etanol en vez de ácido acético. Ben Omar y Ampe (2000) reportaron que esto ocurre debido a que microorganismos aerobios estrictos como *Exiguobacterium*, se desarrollan en las primeras etapas de fermentación del pozol. El porcentaje de ácido láctico fue en aumento en ambas fracciones, por lo que el pH disminuye al transcurrir el tiempo de

fermentación, debido principalmente al crecimiento de BAL, que se encuentran en todos los tiempos de fermentación (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1).

Con respecto a la diferencia en el porcentaje de ácido láctico entre las fracciones (de 24 a 48 h), puede indicar que existe una distribución diferente de BAL, las heterofermentadoras y las homofermentadoras; también esta diferencia pudo haber sido ocasionada por levaduras (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1), ya que en estudios anteriores se ha demostrado que las levaduras aisladas del pozol tienen la capacidad de usar lactato como fuente de carbono (Ampe y cols., 1999). Esto se relaciona con los resultados a las 24 h de fermentación (ácido láctico 0.6 % m/m en la fracción fina y 0.9 % m/m en la fracción gruesa), cuando se presentó una ligera diferencia observándose una mayor cuenta de levaduras en la fracción fina ( $7.9E+04 \pm 5.0E+03$  UFC/g de masa) en comparación con la fracción gruesa ( $5.7E+04 \pm 5.8E+03$  UFC/g de masa); así como en el tiempo 48 h (láctico  $1.3 \pm 0.0$  % m/m en la fracción fina y  $1.1 \pm 0.1$  % m/m en la fracción gruesa), tiempo en el que se observó una mayor cuenta de levaduras en la fracción gruesa ( $4.8E+05 \pm 1.6E+04$  UFC/g de masa) en comparación con la fracción fina ( $3.8E+05 \pm 2.7E+04$  UFC/g de masa).

#### 6.3.4.4 Fibra (pared celular vegetal)

En la fracción gruesa se observó un mayor porcentaje, con diferencia significativa, de fibra proveniente de la pared celular vegetal, en comparación con la fracción fina (Figura 6.6 y Cuadro 10.3.4.1).



**Figura 6.6:** Porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron 1.3 y 0.7 para la variable tiempo y entre 0.9 y 0.5 para la variable tipo de fracción.

Se observó diferencia en el porcentaje (% m/m) de pared celular vegetal entre fracciones. Durante toda la fermentación el porcentaje fue mayor en la fracción gruesa en comparación con la fracción fina.

La pared celular de las plantas está compuesta por varios polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y mucílagos, así como almidón resistente; los cuales se encuentran dentro de la fibra soluble y la fibra insoluble (Matos-Chamorro y Chambilla-Mamani, 2010). La fibra en el maíz tiene un 75 % de hemicelulosa, 25 % de celulosa y 0.1 % de lignina (Chaudhary y cols., 2013). En la nixtamalización del maíz, una parte del almidón se retrograda y se solubiliza gran parte de la hemicelulosa, lo que ocasiona una disminución en la concentración de fibra en la masa (Domínguez-Ramírez y cols., 2017).

El ligero aumento en el porcentaje de fibra (PC) en ambas fracciones a lo largo de la fermentación, se puede deber a la retrogradación del almidón, el cual es más resistente al ataque enzimático, dado que las cadenas de amilosa y de amilopectina forman estructuras ordenadas que eliminan el agua de la gelatinización (Rendon-Villalobos y cols., 2002), y que generalmente se cuantifica dentro del contenido de fibra soluble (Othón, 2001).

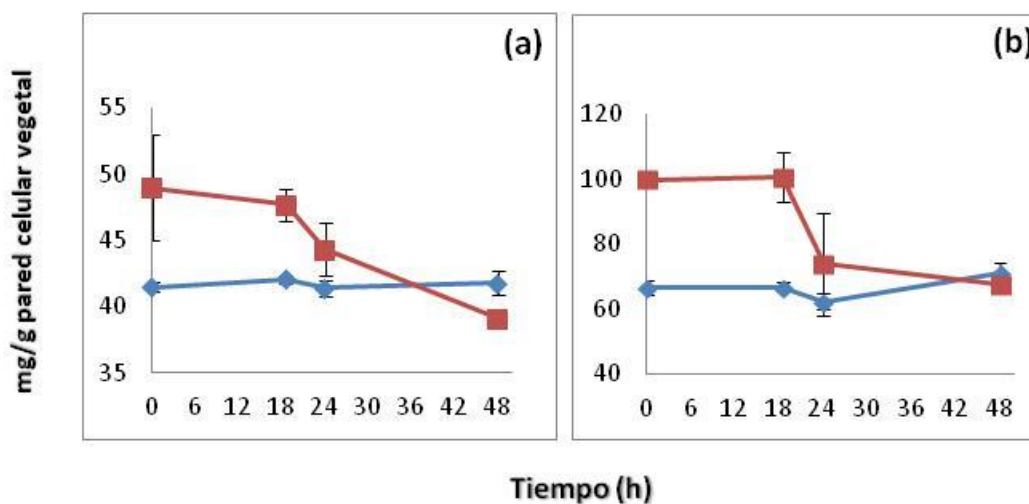
La mayor concentración de fibra en la fracción gruesa, en comparación con la fracción fina, se puede deber a que en la fracción gruesa queda principalmente partes de pericarpio (Othón, 2001; Pflugfelder y cols., 1988), el cual contiene en su mayoría hemicelulosa y celulosa, polisacáridos encontrados principalmente en las paredes celulares (Othón, 2001), además de relacionarse con las concentraciones encontradas en este trabajo (Figura 6.7 y Cuadro 10.3.5.1).

#### **6.3.4.5 Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)**

En la pared celular vegetal se encuentran la celulosa, cuyo producto de hidrólisis es la glucosa y la hemicelulosa, cuyos productos de hidrólisis son el xilano, la arabinosa, el ácido glucurónico y el ácido ferúlico (Barros-Ríos y cols., 2011). Las concentraciones de xilosa y de glucosa se tomaron como medida indirecta de la concentración de hemicelulosa y de celulosa, respectivamente.

En ambas fracciones del tiempo cero a 24 h, las concentraciones de xilosa y de glucosa fueron mayores en la fracción gruesa. A las 48 h, en la fracción gruesa se observó una

menor concentración de ambos carbohidratos, en comparación con la fracción fina (Figura 6.7 y Cuadro 10.3.5.1).



**Figura 6.7:** Concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina ◆ y gruesa ■ de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30 °C. Se presentan los promedios de 3 determinaciones para cada análisis. Los valores de desviación estándar variaron 7.9 y 0.5 para hemicelulosa (xilosa) y entre 31.4 y 3.1 para celulosa (glucosa).

Se observaron diferencias de concentraciones de xilosa y de glucosa entre fracciones. Durante las primeras horas se presentó mayor concentración de hemicelulosa y celulosa en la fracción gruesa en comparación de la fracción fina, al observarse mayor concentración de xilosa y de glucosa. De las 24 a 48 h la concentración fue mayor en la fracción fina.

Dentro de las estructuras del maíz, el pericarpio es el que tiene una mayor concentración de fibra, la cual consiste principalmente en hemicelulosa, celulosa y lignina; la fibra también se encuentra, aunque en menor proporción, en las paredes celulares del endospermo y una pequeña cantidad en las paredes celulares del germen (Chaudhary y cols., 2013). Se ha reportado que el salvado de maíz contiene 75 % de hemicelulosa, 25 % de celulosa y un 0.1 % de lignina en base seca (Chaudhary y cols., 2013). El tratamiento térmico-alcalino de la nixtamalización disuelve la hemicelulosa por lo que la capa de pericarpio se desprende fácilmente del grano de maíz (Bello-Pérez y cols., 2002), lo que ocasiona que parte de la fibra se pierda (Agama-Acevedo y cols., 2004).

En la fracción gruesa la concentración de xilosa (hemicelulosa) y de glucosa (celulosa), fue mayor, en comparación con la fracción fina. En esta fracción (gruesa), la concentración de fibra es mayor, ya que en ella se encuentran los fragmentos de pericarpio que no se eliminaron durante el proceso de elaboración de la masa de pozol. El pericarpio tiene un tamaño de partícula superior al de los gránulos de almidón. Cuando se realiza la molienda húmeda del maíz a nivel industrial, una de las etapas para la extracción de almidón es la tamización después de la molienda, con la finalidad de retener y separar los fragmentos de pericarpio (Othón, 2001).

En la fracción fina no se apreciaron cambios significativos en las concentraciones de xilosa y glucosa, lo que indica que los microorganismos prefieren otra fuente de carbono como sustrato de energía o que en esta fracción no se desarrollaron microorganismos que pudieran hidrolizar la hemicelulosa y celulosa.

Las concentraciones de xilosa (hemicelulosa) y de glucosa (celulosa) presentaron un descenso significativo de las 18.5 a 24 h en la fracción gruesa. De las 24 a 48 h, sólo para la xilosa. Esto indica que se consumieron ambos polisacáridos, lo que se puede relacionar con la demanda de sustratos o carbohidratos disponibles para esta fracción.

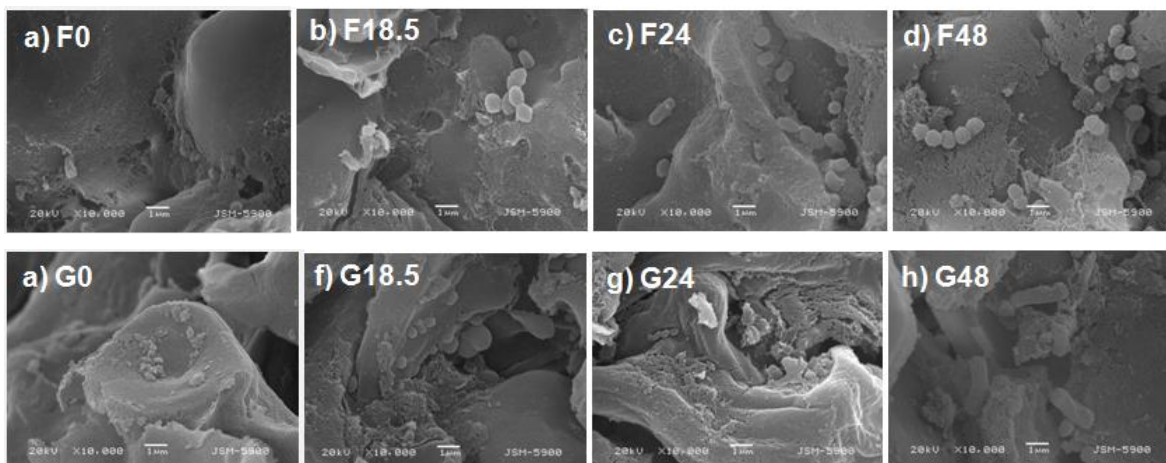
La degradación de celulosa en la fracción gruesa indica la posible existencia de microambientes como lo menciona Wachter-Rodarte (1995). En la fracción gruesa disminuyó la concentración de glucosa, lo cual indica que se degradó la celulosa. Se ha reportado la presencia de bacterias celulolíticas en el rumen que se desarrollan mejor en un pH de entre 6.0 y 6.9.

El porcentaje de hemicelulosa en el maíz que se encontró en este trabajo fue menor que la reportada (Sandstead y cols., 1978; Van Soest y cols., 1979; Chaudhary y cols., 2013), lo cual se puede deber a la solubilización de ésta durante la nixtamalización del maíz (Paredes-López y cols., 2009; Agama-Acevedo y cols., 2004; Bello-Pérez y cols., 2002).

Los enterococos, que son BAL y que se encuentran en el pozol consumen la xilosa, proveniente de la hemicelulosa. Estas bacterias son capaces de usar una amplia variedad de carbohidratos, entre ellos la xilosa (Vos y cols., 2009), por lo que podrían estar desarrollándose mejor en la fracción gruesa para evitar la competencia de sustrato al usar xilosa proveniente de la hemicelulosa.

### 6.3.5 Estudio de microscopía electrónica de barrido

Se incluyen las imágenes representativas de cada fracción (Figura 6.8), ya que se realizó el triplicado como en los análisis anteriores.



**Figura 6.8:** Microorganismos y estructuras en las fracciones fina (F) y gruesa (G), de la masa de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Fracción fina en los tiempos (h): a) 0, b) 18.5, c) 24, d) 48 h. Fracción gruesa en los tiempos (h): e) 0, f) 18.5, g) 24, h) 48 h.

Se observa en la fracción fina, en las figuras F: a) predominan los cocos b) a d) se encuentran cocos y bacilos (los cocos tienen un tamaño aproximado de 0.5  $\mu\text{m}$  a 2.0  $\mu\text{m}$  y los bacilos de 0.5  $\mu\text{m}$  a 2.0  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1.0  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de largo (Desmazeaud,2000), la apariencia es más suave, ya que en ella se observan principalmente gránulos de almidón (Quintanar-Guzmán y cols., 2009), en comparación con la fracción gruesa (G), que se percibe áspera y rugosa, posiblemente debido a que existen partes de pericarpio en las cuales predominan la celulosa y hemicelulosa (Ampe y cols., 1999; Gutiérrez, y cols., 2007). En la figura (f) se aprecian formas ovaladas de mayor tamaño, levaduras.

Conforme avanza el tiempo de fermentación se observan huecos cada vez mayores, lo cual se debería a la degradación de las estructuras (McAllister y cols., 1990) y el número de microorganismos va en aumento. Esto coincide con los resultados de cuenta en placa de los microorganismos, que también fue en aumento conforme avanza la fermentación (Figura 6.1 y Cuadro 10.1.1), con los resultados de Ampe y cols. (1999), que reportaron la presencia de 25 a 50 % de estreptococos en el pozol y la presencia de bacilos en los tiempos



de 24 y 48 h y con lo reportado por Ben Omar y Ampe (2000), que mencionaron que en el pozol se encuentra *Lactobacillus fermentum* en el periodo de 24 a 48 h.

### **6.3.6 Resumen de resultados**

El pozol es una bebida-alimento fermentado a base de maíz, en cuyo proceso de elaboración los procesos de nixtamalización y de molienda son fundamentales para el establecimiento y desarrollo de microorganismos. La nixtamalización contribuye principalmente con la solubilización de las paredes celulares de las células del maíz, lo cual hace accesible al almidón y a la hemicelulosa para su ataque enzimático por parte de microorganismos. Modifica la estructura de proteínas haciendo disponibles aminoácidos esenciales, aumenta el contenido de calcio y lleva a un pH cercano a la neutralidad. La molienda es fundamental porque durante ella se incorporan los microorganismos y porque se obtiene una masa con diferentes tamaños de partícula, ocasionando una distribución diferente de las partes del grano y por lo tanto de los componentes del mismo (Cuadro 6.1). Dentro de la microbiota del pozol predominan las bacterias lácticas y también se encuentran otros microorganismos: enterobacterias, otras bacterias (como las del género *Bacillus*), mohos y levaduras. Las características iniciales de la masa de pozol proporcionadas por la nixtamalización y la molienda favorecen el desarrollo de la microbiota típica, la cual hidroliza enzimáticamente al almidón (sobre todo las BALA) y así contribuyen con la producción de carbohidratos fermentables. En este trabajo se encontró que la concentración de microorganismos al inicio de la fermentación fue mayor en la fracción fina que en la fracción gruesa, lo cual se debe seguramente a que en ésta el contenido de carbohidratos de fácil asimilación es mayor que en la gruesa y en ésta el contenido de fibra y de grasa es mayor. El proceso iniciaría con la hidrólisis de los carbohidratos y la posible liberación del complejo amilosa-lípido formado durante la nixtamalización. La concentración de carbohidratos solubles fue mayor en la fracción fina, primero se observa un aumento y luego un descenso, y en la fracción gruesa primero un descenso y luego un aumento; el aumento en la concentración se debe seguramente a la hidrólisis de carbohidratos y el descenso a su fermentación. En la fracción gruesa, cuyo contenido de fibra es alto, se dificulta la hidrólisis de almidón, porque no está

completamente disponible. El aumento de carbohidratos reductores en la fracción gruesa puede indicar que la hidrólisis es más rápida que su consumo. La disminución de proteínas y de ceniza en ambas fracciones, indican que estos componentes son consumidos por la microbiota. Al final de la fermentación la concentración de microorganismos fue mayor en la fracción gruesa, esto se puede relacionar con el descenso en el contenido de fibra en esta fracción, debido a la presencia de microorganismos capaces de degradar carbohidratos estructurales.

En el pozol ocurre una fermentación natural, durante la cual se desarrolla una microbiota compleja en un equilibrio dinámico. Las BAL son un grupo representativo en el pozol, con necesidades nutricionales exigentes, como aminoácidos, vitaminas, bases nitrogenadas, metales, además de los carbohidratos. Se generan una multitud de metabolitos, sobre todo ácidos orgánicos (principalmente láctico, pero también acético y fórmico), compuestos de sabor como el diacetilo y la acetoína, compuestos antimicrobianos como el peróxido de hidrógeno, las bacteriocinas y enzimas. El pH disminuye, lo que contribuye a evitar el desarrollo de microorganismos perjudiciales. Las levaduras proveen de metabolitos esenciales como piruvato, aminoácidos y vitaminas, y éstas a su vez utilizan metabolitos de BAL como fuente de carbono, como es el caso *S. cerevisiae* y las del género *Candida*, que usan el ácido láctico, maltosa, además de aprovechar el descenso de pH generado por BAL favoreciendo su crecimiento.

En este trabajo se encontró que se desarrollaron microorganismos mesófilos aerobios, EPS, BAL, BALA, levaduras y enterobacterias. Las variaciones en sus cuentas a lo largo de la fermentación indican la existencia de relaciones positivas y negativas entre ellas. Existe una relación negativa entre las BAL y las enterobacterias, ya que el ácido generado por ellas las inhibe, además de la posible competencia por substratos como la glucosa, la fructosa. Se observó que la mayoría de mesófilos aerobios estuvieron constituidos por BAL, que la mayoría de BAL fueron BALA y que la mayoría de BALA fueron EPS, con cuentas similares de cada uno de estos microorganismos a lo largo de la fermentación. El descenso observado en la cuenta de EPS al final de la fermentación en la fracción fina puede ser reflejo de una relación negativa entre este grupo y las enterobacterias, ya que éstas presentaron un aumento en la cuenta en la fracción fina al final de la fermentación.

En este trabajo se observó una diferencia en la composición química y microbiológica entre las dos fracciones a lo largo de la fermentación. La diferencia en la primera se atribuyó a que durante los procesos de nixtamalización y de molienda para la elaboración del pozol, resultan en una masa no homogénea, en la cual la diferencia más importante fue que en la fracción gruesa la concentración de fibra y de grasa fue mayor y en la fina la de carbohidratos fue mayor. Esta influyó las diferencias en el desarrollo de microorganismos que ya se explicó.

Como resultado de la observación en microscopía electrónica de barrido la apariencia de la fracción fina fue más suave, ya que en ella se observaron principalmente gránulos de almidón, en comparación con la fracción gruesa, que se percibió áspera y rugosa, posiblemente debido a que existen partes de pericarpio en las cuales predominan la celulosa y hemicelulosa. Conforme avanza el tiempo de fermentación se observó la formación de huecos cada vez mayores, lo cual se debería a la degradación de las estructuras y al número de microorganismos que fue en aumento.

**Cuadro 6.3:** Resumen de resultados de los cambios en los compuestos y microorganismos encontrados en las fracciones fina y gruesa de la masa de pozol en los tiempos (h) 0,18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C.

ANÁLISIS	T0		INICIO DE LA FERMENTACION (0 A 24 h)		FINAL DE LA FERMENTACIÓN (24 A 48 h)	
	F	G	FINA	GRUESA	FINA	GRUESA
<b>MICROBIOLOGÍA</b>			↑	↑	↑	↑
Mesófilos aerobios	=	=	+			+
BAL	=	=	+			+
BALA	=	=	+			+
EPS	=	=	+		↓	+
Levaduras	=	=	=	=		+
Enterobacterias	=	=	=	=	+	
<b>pH</b>			↓	↓	↓	↓
pH	=	=	=, (+18.5 h)	=	+	
<b>COMPOSICIÓN PROXIMAL</b>						
Carbohidratos	=	=	+, (↑18.5h)		+	
Proteína	=	=	=, (↓18.5h)	=, (↓18.5h)	=	=
Grasa		+		+, (↑18.5h)		+
Fibra	=	=		+, ↑		+, (↓48h)

Ceniza		+	(↓18.5h)	+, (↓18.5h)		+
<b>CARBOHIDRATOS SOLUBLES</b>						
Totales		+	+↑(18.5h), =↓(24h)	↓ (18.5h), =↑ (24h)	↓	+, ↓
Almidón	+		+↑(18.5h), ↓(24h)	↓ (18.5h), +↑ (24h)	↓	+, ↓
Reductores	+		+, (↑18.5h, ↓24h)	↑	+, ↑	
<b>PRODUCTOS DE FERMENTACION</b>						
Sacarosa	=	=	=, ↓	=, ↓	=, ↑	=, ↑
Fructosa	=	=	=, ↓	=, ↓	=	=
Ácido láctico	=	=	=, ↑, (+24 h)	=, ↑	+, ↑	↑
<b>FIBRA (PARED CELULAR)</b>						
FIBRA (PARED CELULAR)		+		+		+
<b>HEMICELULOSA Y CELULOSA</b>						
Xilosa (hemicelulosa)		+		+, (↓24h)	+	↓
Glucosa (Celulosa)		+		+, (↓24h)	=	=

=, igual concentración o cantidad

+, mayor concentración o cantidad

↓, descenso en la concentración o cantidad

↑, aumento en la concentración o cantidad

## **7 CONCLUSION GENERAL**

En este estudio se encontraron diferencias en la composición química y en el desarrollo de microorganismos entre las fracciones fina y gruesa a lo largo de la fermentación de nixtamal para obtener pozol.

### **7.1 CONCLUSIONES PARTICULARES**

- Se estudiaron dos fracciones: una fina, porción de masa liofilizada que atraviesa el tamiz con malla No. 20 (850  $\mu\text{m}$ ) y fracción gruesa, porción de masa liofilizada que queda en el tamiz y se encontraron diferencias en la composición química, pH y composición microbiológica entre las fracciones a lo largo de la fermentación. Los porcentajes de grasa, ceniza y fibra fueron mayores en la fracción gruesa y los carbohidratos se encontraron en mayor porcentaje en la fracción fina. Las concentraciones de carbohidratos solubles durante la fermentación en la fracción fina presentaron la misma tendencia para totales y almidón, al igual que ambos en la fracción gruesa; en los carbohidratos reductores se presentó una mayor concentración en la fracción fina en comparación con la gruesa. El porcentaje de fibra proveniente de la pared celular vegetal, fue mayor en la fracción gruesa. Las concentraciones de hemicelulosa y de celulosa fueron mayores en la fracción gruesa, pero al final de la fermentación fue mayor en la fracción fina. El pH disminuyó y la cuenta de los grupos microbianos aumentó, en ambas fracciones conforme avanzó el tiempo de fermentación.
- Se presentó una mayor cuenta de mesófilos aerobios, EPS, BAL y BALA en la fracción fina en comparación con la fracción gruesa al inicio de la fermentación. Al final de la fermentación se observó una mayor cuenta de estos microorganismos y levaduras en la fracción gruesa. El único grupo que presentó un descenso, fue EPS en la fracción fina al final de la fermentación. Las enterobacterias no se desarrollaron sino hasta las 24 h de fermentación en ambas fracciones y al final de la fermentación presentaron mayor cuenta en la fracción fina en comparación con la gruesa.

En este trabajo se observaron diferencias entre las fracciones a lo largo de la fermentación. Al inicio de la fermentación el crecimiento de microorganismos fue mayor en la fracción fina que en la fracción gruesa, se observó un aumento en el porcentaje de carbohidratos y en la concentración de carbohidratos solubles (almidón, totales y reductores) en la fracción fina y en la fracción gruesa se observó un descenso en el porcentaje de fibra. Esto indica que en la fracción fina se establecieron microorganismos que prefieren carbohidratos como el almidón y en la gruesa microorganismos capaces de degradar la fibra.

Al final de la fermentación el desarrollo de microorganismos fue mejor en la fracción gruesa, las concentraciones de hemicelulosa y celulosa disminuyeron. El grupo EPS presentó un descenso en la cuenta en la fracción fina, se observó un aumento de enterobacterias lo que indica que este grupo no se adapta en ambientes con porcentaje elevado de fibra y presenta competencia con el grupo EPS.

Lo anterior coincide con que en la observación de muestras de ambas fracciones por microscopía electrónica de barrido, las de la fracción fina fueron más suaves y las de la gruesa rugosas; en ambas durante la fermentación se incrementa el tamaño de los huecos y la cantidad de microorganismos.

## **8 PERSPECTIVAS**

Se propone continuar el estudio con análisis de genómica y de proteómica, para contar con un mayor conocimiento del tipo de microorganismos presentes en las fracciones a lo largo de la fermentación, así como la influencia que tiene la diferente granulometría del pozol en algún tipo de microorganismo ya que la gran mayoría de las bacterias no son cultivables en los medios de cultivo.

También se propone analizar más tiempos de fermentación principalmente antes del tiempo 18.5 h, con el fin de determinar la cinética de la fermentación. Obtener un mayor número de fracciones para comprender mejor el efecto de la granulometría en su composición.

Se propone estudiar con más detalle el efecto de la acción de las bacterias lácticas en la inocuidad del producto.

En el largo plazo, desarrollar un producto con la mezcla de fracciones con las que sea posible obtener un producto con las características sensoriales similares a las del producto original.

## 9 REFERENCIAS

1. Agama-Acevedo, E., Ottenhof, M. A., Farhat, I. M., Paredes-López, O., Ortíz-Cereceres, J. y Bello-Pérez L. A., 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia*, 29(11), pp. 643-649.
2. Agati, V., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J. Talamond, P. y Hounhouigan, D. J., 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from benin. *Journal of Applied Microbiology*, 85, pp. 512-520.
3. Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. y Guyot, J. P., 1999. Polyphasic Study of the Spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maiz Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), pp. 5464-5473.
4. Aznar, R., Dueñas, T., Jiménez, R., López, P. y Ruas-Madiedo, P., *Exopolisacaridos de bacterias lácticas, ¿me quieren o no me quieren?* [En línea] (Actualizado al 07 de diciembre de 2017). Disponible en: <http://redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/Exopolisacaridos%20BAL.pdf> [Último acceso el 07 de diciembre de 2017].
5. Barros-Rios, J., Malvar, R. A. y Santiago, R., 2011. Función de la pared celular del maíz (*Zea mays* L.) como mecanismo de defensa frente a la plaga del taladro (*Ostrina nubilans* Hüb. y *Sesamia nonagrioides* Lef.). *REB*, 30(4), pp.132-142.
6. Bartolo-Pérez, P., Peña, J. L., Cruz-Orea, A. y Calderón, A., 1999. Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX; *Superficies y vacío*, 8, pp.64-68.
7. Bayer, E. A., Shoham, Y. y Lamed, R., 2013. Lignocellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. *The Prokaryotes*, pp.215-266.
8. Bello-Pérez, L. A., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Nuñez-Santiago, C. y Paredes-López, O., 2002. Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*, 36(3), pp. 319-328.
9. Ben Omar, N. y Ampe, F., 2000. Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp. 3664-3673.
10. Betancourth, M., Botero, J. y Rivera, S., 2004. Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35(3), pp. 34-39.
11. Blanco-Gámez, E. A., Escalante, A., Sánchez-González, M. N., Valladares, A. G. y Olvera, C., 2008. Identificación de microorganismos aislados del Nejayote, *Revista Salud Pública y Nutrición*, 13.
12. Brauman, A., Kéléké S., Malonga, M., Miambi, E. y Ampe F., 1996. Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo(cassava flour) production. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), pp.2854-2858.
13. Cañas, A., Barzana, E., Owens, J. D. y Wachter, C., 1993. La elaboración de pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia*, 44, pp.219-229.



14. Casanova-Ortíz, J. S. y González-Olivares, L. G., 2016. Estudio de la capacidad proteolítica de bacterias ácido lácticas en una fermentación de maíz de cacahuazintle. *PÄDI Boletín Científico de Ciencias Básicas e ingenierías del ICBI*, 3(6).
15. Castro-Martínez, C., Valverde, M. E. y Paredes-López, O., 2009. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Ide@s CONCYTEG*, 54, pp.1246-1270.
16. Chaudhary, P. D., Kumar, S. y Sapna, L., 2013. *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Nueva Delhi: Springer Science & Business Media.
17. Cooper-Bribiesca, B. L. 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1), pp.19-22.
18. Cruz-Huerta, E. y Verdalet-Guzmán, I., 2007. Tortillas de maíz: una tradición muy nutritiva. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana*, 20(3), pp.1-3.
19. DACSA GROUP. 2017. El grano de maíz. [En línea] (Actualizado al 01 de junio de 2018). Disponible en: <http://www.dacsa.com/blog/grano-maiz/> [Último acceso el 01 de junio de 2018].
20. D'Mello, J. P.F., 2004. Microbiology of animal feeds. En: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ed. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*. Roma: Food & Agriculture Org., pp. 89-106.
21. Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. y Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: de Roissart, H. y Luquet, F. M. eds. *Bactéries lactiques*. Uriage, France: Loriga, 1, pp. 25-116.
22. Dendy, D. A. V. y Dobraszczyk, B. J., 2004. *Cereales y productos derivados: química y tecnología*. Zaragoza: Acribia.
23. Desmazeaud, M., 2000. Las tendencias lácticas de la investigación sobre cultivos lácticos en Europa. *Revista Argentina de lactología*, 19, pp.46-65.
24. Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J. y 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), pp.4367-4374.
25. Domínguez-Ramírez, L. L., Díaz-Ruiz, G. y Wachter, C., 2017. Maize (*Zea mays* L. subsp. *mays*) Fermentation. En: Ray, R. y Montet, D. eds. *Fermented Food, Part II: Technological Interventions*. Boca Raton: CRC Press, 9.
26. Escalante, A., Wachter, C. y Farrés, A., 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp.21-31
27. Escobar-Erices, Y. 2011. *Vive la ciencia*. [En línea] (Actualizado al 19 de marzo de 2011). Disponible en: [http://viveciencia.blogspot.mx/2011/04/19-de-marzo-2011\\_10.html](http://viveciencia.blogspot.mx/2011/04/19-de-marzo-2011_10.html) [Último acceso el 3 de mayo de 2013].
28. Flores-Gallardo, H., Castillo-Rosales, A., Santana-Espinoza, S., Jiménez-Ocampo, R. y Domínguez-Martínez, P. A., 2013. Recomendaciones para la producción de grano y forraje de maíz bajo riego en Durango, [En línea] (Actualizado al 01 de junio de 2018). Disponible en: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Partes-subteranea-y-aerea-que->

[componen-a-una-planta-de-maiz-adaptado-de\\_fig1\\_322924153](#) [Último acceso el 01 de junio de 2018).

29. Flores-Ramírez, E., *Pozol: una bebida fermentada tradicional de México*. [En línea] (Actualizado al 07 de diciembre de 2017). Disponible en: [http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/177\\_cienciorama.pdf](http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/177_cienciorama.pdf) [Último acceso el 07 de diciembre de 2017).
30. Frazier, W. C. y Westhoff, D. C., 1993. *Microbiología de los alimentos*. 4ª edición. Zaragoza : Acribia.
31. García, C. A., Arrázola, G. S. y Durango, A. M., 2010. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas agrarios*, 15(2), pp. 9-16.
32. Giraud, E., Champaviller, A. y Raimbault, M., 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of lactobacillus plantarum. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), pp. 4319-4323.
33. Gutierrez, E., Rojas-Molina, I., Pons- Hernández, J. L., Guzman, H., Aguas-Angel, B., Arenas, J., Fernandez, P., Palacios-Fonseca, A., Herrera, G. y Rodríguez, M. E., 2007. Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein maize as a function of cooking temperature. *Cereal Chemistry*, 84(2), pp. 186-194.
34. Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A. K. y Jakobsen, M., 1993. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology*, 19(2), pp. 135-143.
35. Hamad, S. H., Böcker, G., Vogel, R. F. y Hammes, W. P., 1992. Microbiological and chemical analysis of fermentes sorghum dough for kiswa production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(6), pp.728-731.
36. Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D., 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(3), pp. 718-726.
37. Holzapfel, W. H., 2014. Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms En: Todorov, S. D., Holzapfel, W. H. eds. *Advances in Fermented Food and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Kidlington: Elsevier, 6.
38. Hubbe, M. A., Venditti, R. A. y Rojas, O. J., 2007. What happens to cellulosic fibers during papermaking and recycling? A review. *BioResources*, 2(4), pp. 739-788.
39. Jay J. M., 2002. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 4ª edición. Zaragoza: Acribia.
40. Jiménez, F. y Moreno, J., 2000. El ensilaje una alternativa para la conservación de forrajes. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA*, pp. 1-25.
41. Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), pp.209-224.
42. Konings, W. N. y Otto, R., 1983. Energy, transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), pp. 247-255.
43. Kurtzman, C., Fell, J. W. y Boekhout, T., 2011. *The yeast: A taxonomic study*. 5ª edición, San Diego: Elsevier.
44. Laboratorios britania, 2017. *Agar MRS*. [En línea] (Actualizado noviembre de

- 2015). Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02205%20REV%2001-MRS%20AGAR.pdf> [Último acceso el 08 de diciembre de 2017].
45. Laboratorios britania, 2017. *Agar PCA*. [En línea] (Actualizado noviembre de 2015). Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02112%20REV%2001-RECuento%20PLACAS%20AGAR.pdf> [Último acceso el 08 de diciembre de 2017].
46. Laguna, J., Piña, E., Martínez-Montes, F., Pardo-Vázquez, J. P. y Riveros-Rosas, H., 2009. *Bioquímica de Laguna*. 6ª edición. Ciudad de México: El manual moderno.
47. Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Von Wright, A., 2011. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4ª edición. Boca Raton: CRC Press.
48. Lamadrid-Avendaño, A., Bernal-Gracida, L. A. y Morales-Meza, M. G., 2009. Capacidad de adhesión y fermentación a gránulos de almidón de papa por bacterias ácido lácticas silvestres para evaluar su actividad como prebiótico. *Revista del Centro de Investigación*, 8(31), pp. 5-21.
49. Leveau, J. Y. y Bouix, M., 2000. *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza: Acribia.
50. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zil, W. H. y Preterius, I. S., 2002. Microbial cellulosa utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), pp. 506-577.
51. Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J., Brock, T. D., Rodríguez-Fernández, C. y Sánchez-Pérez, M., 2004. *Brock biología de los microorganismos*. 10ª edición, España: Pearson Educación.
52. Matos-Chamorro, A. y Chambilla-Mamani, E., 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), pp. 4-17.
53. McAllister, T. A., Cheng, K. -J., Rode, L. M. y Forsberg, C. W., 1990. Digestion of barley, maize y wheat by selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), pp. 3146-3153.
54. Medina, J. A. y Salas, J. C., 2008. Caracterización morfológica del gránulo de almidón nativo: Apariencia, forma, tamaño y su distribución. *Revista de ingeniería*, 27, pp. 56-62.
55. Mengistu, Y., Edwards, C. y Saunders, J. R., 1994. Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1. *Journal of Applied Microbiology*, 76(5), pp. 424-430.
56. 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(2), pp. 159-168.
57. Mora-Escobedo, R., Osorio-Díaz, P., García-Rosas, M. I., Bello-Pérez A. y Hernández-Unzón, H., 2009. Cambios en nutrientes seleccionados y microestructura del maíz mejorado “Costeño” y el maíz común durante la preparación y el almacenamiento de tortillas. *Mundo Aliment*, 2, pp.12-18.

58. Morlon-Guyot, J., Guyot, J. P., Pot, B., Jacobe de Haut, I. y Raimbault, M., 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pp. 1101-1109.
59. Náchter-Vázquez, M., Ibarduru-López, I., Notararigo, S., Fernández-De Palencia Delgado, P., Aznar-Novella, R., Dueñas-Chasco, M. T. y López-García, P., *Aplicación de los exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas en la calidad y funcionalidad de los alimentos*. [En línea] (Actualizado al 07 de diciembre de 2017). Disponible en: [http://www.old.cib.csic.es/repositorio\\_bd/publicacion/4128/urls\\_documento/5D\\_Exopolisacarios\\_final.pdf](http://www.old.cib.csic.es/repositorio_bd/publicacion/4128/urls_documento/5D_Exopolisacarios_final.pdf) [Último acceso el 07 de diciembre de 2017].
60. Navia, D. P., Villada, H. S. y Mosquera, S. A., 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(2), pp.118-128.
61. Norma oficial Mexicana NMX-Y-093-SCFI-2003. *Determinación de cenizas*.
62. Norma oficial Mexicana NMX-Y-098-SCFI-2001. *Determinación de humedad*.
63. Norma oficial Mexicana NMX-F-317-S-1978. *Determinación de pH en alimentos*.
64. Norma oficial Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2002. *Determinación de proteínas*.
65. Norma oficial Mexicana NMX-F-613-NORMEX-2003. *Determinación de fibra cruda*.
66. Norma oficial Mexicana NMX-F-615-NORMEX-2004. *Determinación de Extracto Etéreo*.
67. Norma oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. *Agar VRBA (Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa)*.
68. Norma oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. *Agar PDA (Agar papa dextrosa)*.
69. Nuraida, L., Wachter M. C. y Owens, J. D., 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, pp. 567-571.
70. Nwankwo, D., Anadu E. y Usoro, R., 1989. Cassava-fermenting organisms. *MIRCEN Journal*, 5, pp. 169-179.
71. Olimpia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. 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), pp. 124-130.
72. Othón, S.R., 2001. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*, Ciudad de México: AGT Editor, S.A.
73. Paredes-López, O., Guevara-Lara, F. y Bello-Pérez, L.A., 2009. La Nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92-93, pp.60-70.
74. Pflugfelder, R.L., Rooney, L.W. y Waniska, R. D., 1988. Fractionation and Composition of Commercial Corn Masa. *Cereal Chemistry*, 65(3), pp.262-266.
75. Quintanar-Guzman, A., Jaramillo-Flores, M. E., Mora-Escobeso, R., Chel-Guerrero, L. y Solorza-Feria, J., 2009. Changes on the structure, consistency, physicochemical and viscoelastic properties of corn (*Zea mays* sp.) under different nixtamalization conditions. *Elsevier, Carbohydrate Polymers*, 78,

- pp.908-916.
76. Rendon-Villalobos, R., Bello-Pérez, L. A., Osorio-Díaz, P., Tovar, J. y Paredes-López, O., 2002. Effect of storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of nixtamal, masa, and tortilla. *Cereal Chemistry*, 79(3), pp. 340-344.
  77. Robles, R. R., Murray, E. D. y Paredes-López, O., 1988. Physicochemical changes of maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(1), pp. 91-98.
  78. Rodríguez-Mega, E. y Hernández-Marroquín, V. 2013. *Relatos breves sobre evolución y regulación genética*. [En línea] (Actualizado al 6 de octubre del 2013). Disponible en: <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php/todos-los-numeros/numeros-anteriores/10-relatos-breves-sobre-evolucion-y-regulacion-genetica?showall=&start=1> [Último acceso el 30 de noviembre de 2017].
  79. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. y Zoon, P., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2), pp. 163-171.
  80. Ruiz, B. O., Castillo, Y., Anchondo, A., Rodríguez, C., Beltrán, R., La O, O. y Payán, J., 2009. Efectos de enzimas e inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz. *Archivos de zootecnia*; 58 (222), pp.163-172.
  81. SAGARPA. 2010. *Fortalece México autosuficiencia en la producción de maíz blanco*. [En línea] (Actualizado al 22 de enero de 2017). Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC\\_0033-22.aspx](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0033-22.aspx). [Último acceso el 30 de noviembre de 2017].
  82. Sahai, D., Buendia, M. O. y Jackson, D. S., 2001. Analytical Techniques for Understanding Nixtamalized Corn Flour: Particle Size and Funtionality Relationships in a Masa Flour Sample. *Cereal Chemistry*, 78(1), pp.14-18.
  83. Sainz, T., Pérez, J., Villaseca, J., Hernandez, U., Eslava, C., Mendoza, G. y Wachter, C., 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic Escherichia coli strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 105, pp. 357-367.
  84. Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A. y Eslava C., 2001. Survival and characterization of Escherichia coli strains in a typical Mexican Acid-Fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 71, pp. 169-176.
  85. Salinas-Moreno, Y., Herrera-Corredor, J. A.; Castillo-Merino, J. y Pérez-Herrera, P., 2003. Cambios físico-químicos del almidón durante la nixtamalización del maíz en variedades con diferente dureza de grano; *Archivo Latinoamericanos de Nutrición*, 53(2), pp.189-193.
  86. Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. y Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1), pp. 93-106.
  87. Sandoval, Z. E., 2005. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Ciudad de México: UNAM, Cuadernos del Instituto de Biología 38.
  88. Sandstead H. H., Muñoz, J. M., Jacob, R. A., Klevay, L. M., Reck, S. J., Logan,

- J. M., Dintzin, F. R., Ingett, G. E. y Shuey, W. C., 1978. Influence of dietary fiber on trace element balance. *The American Journal Clinical Nutrition*, 31(10), pp. 5180-5184.
89. Sarmiento, A. y Herrera, J., 2003. *Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica*. Trabajo de grado (Microbiología industrial). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 3.
  90. Schoreder, J. W., 2004. *Silage fermentation and preservation*. North Dakota: NDSU Extension Service.
  91. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., 2007. *Introducción a la microbiología*. 9ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.
  92. Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P., 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. *Instituto nacional indigenista*, 16, pp.13-20.
  93. Van Soest, P. J., Fadel, J. y Sniffen, C. J., 1979. Discount factors for energy and protein in ruminant feeds. En: *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures*, Ithaca, Cornell University, pp. 63-75.
  94. Vasanthan, T. y Bhathy, R. S., 1996. Physicochemical properties of small and large granule starches of waxy, regular, and high amilose barleys. *Cereal Chemistry*, 73(2), pp. 199-207.
  95. Villamil, Y. y Zapata, Y., 1999. Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
  96. Vital-López, P. y Larralde-Corona, C. P., 2016. Respuesta metabólica al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia, de la universidad autónoma de Aguascalientes*, 67, pp. 86-91.
  97. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H. y Whitman, W. B., 2009. *Bergey's Manual ® of Systematic Bacteriology*. 2ª edición. New York: Springer-Verlag.
  98. Wachter, C., 2014. La biotecnología alimentaria antigua: Los alimentos fermentados. *RDU revista digital universitaria*, 15(8), pp. 1-14.
  99. Wachter, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. y Owens, J. D., 2000. Microbiology of Indian and mestizo pozol fermentation. *Food Microbiology*, 17, pp.251-256.
  100. Wachter-Rodarte, M. C., 1995. *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
  101. Wilches-Flóres, A. M., 2005. Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS). *Bistua*, 3(2), pp. 12-18.
  102. Wingender, J., Neu T. R. y Flemming H., 2012. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
  103. Witzig, M., Boguhn, J., Kleinstaub, I., Fetzer, M. y Rodehutschord, M., 2010. Effect of the corn silage to grass silage ratio and feed particle size of diets for ruminants on the ruminal Bacteroides-Prevotella community in vitro. *Elsevier, Anaerobe*, 16, pp. 412-419.
  104. Zhao, G. y Zhang, G., 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), pp. 333-338.

## 10 ANEXOS

### 10.1 MICROBIOLOGÍA

**Cuadro 10.1.1:** Cuenta de microorganismos (UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente en la misma columna, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

(a) mesófilos aerobios $\alpha = 0.01$		(b) ESP $\alpha = 0.01$		(c) BAL $\alpha = 0.01$	
Tiempo 0 Gruesa	2.7E+04 $\pm$ 1.6E+03 a	Tiempo 0 Gruesa	2.6E+04 $\pm$ 3.1E+03 a	Tiempo 0 Fina	3.1E+03 $\pm$ 1.0E+03 a
Tiempo 0 Fina	3.3E+04 $\pm$ 3.7E+03 a	Tiempo 0 Fina	3.2E+04 $\pm$ 2.7E+03 a	Tiempo 0 Gruesa	3.1E+03 $\pm$ 1.0E+03 a
Tiempo 18.5 Gruesa	4.6E+05 $\pm$ 6.1E+04 a	Tiempo 18.5 Gruesa	2.9E+05 $\pm$ 7.7E+04 a	Tiempo 18.5 Gruesa	4.0E+05 $\pm$ 1.0E+05 a
Tiempo 18.5 Fina	1.5E+06 $\pm$ 5.1E+05 a	Tiempo 18.5 Fina	7.4E+05 $\pm$ 6.1E+04 a	Tiempo 18.5 Fina	8.9E+05 $\pm$ 9.9E+04 a
Tiempo 24 Gruesa	4.6E+06 $\pm$ 4.6E+05 b	Tiempo 48 Fina	2.2E+06 $\pm$ 1.1E+06 b	Tiempo 24 Gruesa	3.8E+06 $\pm$ 5.9E+05 a
Tiempo 24 Fina	8.1E+06 $\pm$ 4.4E+05 c	Tiempo 24 Gruesa	2.2E+06 $\pm$ 3.0E+05 b	Tiempo 24 Fina	6.5E+06 $\pm$ 5.7E+05 b
Tiempo 48 Fina	2.2E+07 $\pm$ 2.0E+06 d	Tiempo 24 Fina	7.7E+06 $\pm$ 5.2E+05 c	Tiempo 48 Fina	2.0E+07 $\pm$ 2.1E+06 c
Tiempo 48 Gruesa	6.2E+07 $\pm$ 3.5E+06 e	Tiempo 48 Gruesa	1.2E+07 $\pm$ 1.8E+06 d	Tiempo 48 Gruesa	6.1E+07 $\pm$ 5.5E+06 d

(d) BALA $\alpha = 0.01$		(e) levaduras $\alpha = 0.01$		(f) enterobacterias $\alpha = 0.01$	
Tiempo 0 Fina	2.2E+03 $\pm$ 5.9E+02 a	Tiempo 18.5 Fina	1.1E+03 $\pm$ 7.9E+00 a	Tiempo 0 Fina	0.0E+00 $\pm$ 0.0E+00 a
Tiempo 0 Gruesa	2.6E+03 $\pm$ 5.1E+02 a	Tiempo 0 Gruesa	1.4E+03 $\pm$ 5.8E+02 a	Tiempo 0 Gruesa	0.0E+00 $\pm$ 0.0E+00 a
Tiempo 18.5 Gruesa	3.2E+05 $\pm$ 3.0E+04 a	Tiempo 0 Fina	2.2E+03 $\pm$ 2.6E+02 a	Tiempo 18.5 Fina	0.0E+00 $\pm$ 0.0E+00 a
Tiempo 18.5 Fina	8.1E+05 $\pm$ 1.8E+05 a	Tiempo 18.5 Gruesa	2.3E+03 $\pm$ 4.1E+02 a	Tiempo 18.5 Gruesa	0.0E+00 $\pm$ 0.0E+00 a
Tiempo 24 Gruesa	3.1E+06 $\pm$ 1.8E+06 a	Tiempo 24 Gruesa	5.7E+04 $\pm$ 5.8E+03 b	Tiempo 24 Gruesa	3.3E+04 $\pm$ 1.2E+02 b
Tiempo 24 Fina	5.6E+06 $\pm$ 1.5E+06 b	Tiempo 24 Fina	7.9E+04 $\pm$ 5.0E+03 b	Tiempo 24 Fina	3.6E+04 $\pm$ 1.3E+02 b
Tiempo 48 Fina	1.1E+07 $\pm$ 2.7E+06 c	Tiempo 48 Fina	3.8E+05 $\pm$ 2.7E+04 c	Tiempo 48 Gruesa	3.9E+04 $\pm$ 6.1E+03 b
Tiempo 48 Gruesa	1.7E+07 $\pm$ 1.7E+06 d	Tiempo 48 Gruesa	4.8E+05 $\pm$ 1.6E+04 d	Tiempo 48 Fina	5.6E+04 $\pm$ 7.5E+03 c

**Cuadro 10.1.2:** Análisis de varianza en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$  UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) mesófilos aerobios</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	7275854743995850.0	3	2425284914665280.0	1121.4	3.24	5.29	**
Tipo	480315894322299.0	1	480315894322299.0	222.1	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	1982319969971210.0	3	660773323323736.0	305.5	3.24	5.29	**
Error	34603429633034.5	16	2162714352064.7				
Total	13469100700585300.0	24					

<b>(b) EPS</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	220290442795313.0	3	73430147598437.6	121.8	3.24	5.29	**
Tipo	6610347438865.0	1	6610347438865.0	11.0	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	190309970730366.0	3	63436656910121.9	105.2	3.24	5.29	**
Error	9647641757279.4	16	602977609830.0				
Total	670125901280231.0	24					

<b>(c) BAL</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	6821433790924260.0	3	2273811263641420.0	519.8	3.24	5.29	**
Tipo	518632818669683.0	1	518632818669683.0	118.6	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	1936726006356050.0	3	645575335452018.0	147.6	3.24	5.29	**
Error	69990971653479.6	16	4374435728342.5				
Total	12570242515252600.0	24					

<b>(d) BALA</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	771282172801966.0	3	257094057600655.0	131.7	3.24	5.29	**
Tipo	3010496149274.6	1	3010496149274.6	1.5	4.49	8.53	NS
Tiempo x Tipo	58183114046086.7	3	19394371348695.6	9.9	3.24	5.29	**
Error	31241490858613.5	16	1952593178663.3				
Total	1408771396591090.0	24					



<b>(e) levaduras</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	770252076477.6	3	256750692159.2	1969.8	3.24	5.29	**
Tipo	2155544976.8	1	2155544976.8	16.5	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	12590375376.4	3	4196791792.1	32.2	3.24	5.29	**
Error	2085495953.1	16	130343497.1				
Total	1168417684730.1	24					

<b>(f) enterobacterias</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	10511758260.7	3	3503919420.2	299.8	3.24	5.29	**
Tipo	154741895.0	1	154741895.0	13.2	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	317013495.3	3	105671165.1	9.0	3.24	5.29	**
Error	186993052.2	16	11687065.8				
Total	21172424396.2	24					

**Cuadro 10.1.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$  UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(a) mesófilos aerobios</b>							
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$					Interpretación	
	1	2	3	4	5	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Gruesa	27051.9					27051.9 ± 1582.3 a	
Tiempo 0 Fina	32609.9					32609.9 ± 3747.5 a	
Tiempo 18.5 Gruesa	458552.5					458552.5 ± 60828.4 a	
Tiempo 18.5 Fina	1514767.2	1514767.2				1514767.2 ± 506898.7 a	
Tiempo 24 Gruesa		4593138.2	4593138.2			4593138.2 ± 457902.7 b	
Tiempo 24 Fina			8095626.0			8095626 ± 441048.6 c	
Tiempo 48 Fina				22101307.1		22101307.1 ± 2032645.7 d	
Tiempo 48 Gruesa					62454425.9	62454425.9 ± 3536269.9 e	

<b>(b) EPS</b>						
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Guesa	26367.6				26367.6 $\pm$ 3148.2 a	
Tiempo 0 Fina	31587.6				31587.6 $\pm$ 2742 a	
Tiempo 18.5 Guesa	286577.2	286577.2			286577.2 $\pm$ 76852.4 a	
Tiempo 18.5 Fina	740720.7	740720.7			740720.7 $\pm$ 61309.1 a	
Tiempo 48 Fina		2210234.0			2210234 $\pm$ 1062503.5 b	
Tiempo 24 Guesa		2228808.2			2228808.2 $\pm$ 303750.6 b	
Tiempo 24 Fina			7653122.0		7653122 $\pm$ 523768.7 c	
Tiempo 48 Guesa				12292434.1	12292434.1 $\pm$ 1821709.8 d	

<b>(c) BAL</b>						
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Fina	3055.5				3055.5 $\pm$ 1012.8 a	
Tiempo 0 Guesa	3080.5				3080.5 $\pm$ 1022.9 a	
Tiempo 18.5 Guesa	404549.4				404549.4 $\pm$ 100344.8 a	
Tiempo 18.5 Fina	891573.1				891573.1 $\pm$ 98558.2 a	
Tiempo 24 Guesa	3770650.2	3770650.2			3770650.2 $\pm$ 591996.2 a	
Tiempo 24 Fina		6460878.8			6460878.8 $\pm$ 567854.4 b	
Tiempo 48 Fina			20407011.0		20407011 $\pm$ 2056506.4 c	
Tiempo 48 Guesa				60773226.6	60773226.6 $\pm$ 5483936.9 d	

<b>(d) BALA</b>						
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Fina	2208.5				2208.5 ± 592.5 a	
Tiempo 0 Guesa	2567.5				2567.5 ± 509.5 a	
Tiempo 18.5 Guesa	320396.0				320396 ± 29640 a	
Tiempo 18.5 Fina	808302.2				808302.2 ± 178083.8 a	
Tiempo 24 Guesa	3084586.3	3084586.3			3084586.3 ± 1780169 a	
Tiempo 24 Fina		5610022.8			5610022.8 ± 1523399.5 b	
Tiempo 48 Fina			11225032.3		11225032.3 ± 2713713.1 c	
Tiempo 48 Guesa				17071386.6	17071386.6 ± 1653531.4 d	

<b>(e) levaduras</b>						
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 18.5 Fina	1110.9				1110.9 ± 7.9 a	
Tiempo 0 Guesa	1386.8				1386.8 ± 582.8 a	
Tiempo 0 Fina	2241.1				2241.1 ± 264.4 a	
Tiempo 18.5 Guesa	2259.7				2259.7 ± 410.8 a	
Tiempo 24 Guesa		57258.0			57258 ± 5796.1 b	
Tiempo 24 Fina		78559.6			78559.6 ± 4977.4 b	
Tiempo 48 Fina			384385.3		384385.3 ± 27111.5 c	
Tiempo 48 Guesa				481208.9	481208.9 ± 15772.4 d	

<b>(f) enterobacterias</b>					
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$			Interpretación	
	1	2	3	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Fina	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 0 Gruesa	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 18.5 Fina	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 18.5 Gruesa	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 24 Gruesa		32909.5		32909.5 ± 120.5 b	
Tiempo 24 Fina		35711.7		35711.7 ± 128.7 b	
Tiempo 48 Gruesa		38591.2		38591.2 ± 6056.4 b	
Tiempo 48 Fina			56102.7	56102.7 ± 7535.6 c	

**Cuadro 10.1.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados en la cuenta de microorganismos ( $\log_{10}$  UFC/g de masa): (a) mesófilos aerobios, (b) EPS, (c) BAL, (d) BALA, (e) levaduras y (f) enterobacterias, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0 , 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) mesófilos aerobios</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	3075680633007.0	2	1537840316503.5	0.0	3.59	6.11	NS
Error	2013847718971240.0	17	118461630527720.0				

<b>(b) EPS</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	1353683651934.6	2	676841825967.3	0.1	3.55	6.01	NS
Error	205214276274576.0	18	11400793126365.3				

<b>(c) BAL</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	6032948963214.3	2	3016474481607.2	0.0	3.59	6.11	NS
Error	2000684029046320.0	17	117687295826254.0				

<b>(d) BALA</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	5314465521276.4	2	2657232760638.2	0.5	3.55	6.01	NS
Error	87120635532698.4	18	4840035307372.1				

<b>(e) levaduras</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	30325103.2	2	15162551.6	0.0	3.59	6.11	NS
Error	14645546226.2	17	861502719.2				

<b>(f) enterobacterias</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	612516.0	2	306258.0	0.0	3.59	6.11	NS
Error	503394031.4	17	29611413.6				

## 10.2 pH

**Cuadro 10.2.1:** Valores de pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

<b>pH</b>	<b><math>\alpha = 0.01</math></b>
TIEMPO 48 FINA	4.93 $\pm$ 0.03 a
TIEMPO 48 GRUESA	4.98 $\pm$ 0.02 b
TIEMPO 24 FINA	5.19 $\pm$ 0.01 c
TIEMPO 24 GRUESA	5.20 $\pm$ 0.01 c
TIEMPO 18.5 FINA	6.15 $\pm$ 0.01 d
TIEMPO 18.5 GRUESA	6.19 $\pm$ 0.01 e
TIEMPO 0 GRUESA	7.18 $\pm$ 0.02 f
TIEMPO 0 FINA	7.21 $\pm$ 0.01 f

**Cuadro 10.2.2:** Análisis de varianza del pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

pH							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	18.85	3	6.28	29567.92	3.24	5.29	**
Tipo	0.00	1	0.00	8.65	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	0.00	3	0.00	7.03	3.24	5.29	**
Error	0.00	16	0.00				
Total	848.29	24					

**Cuadro 10.2.3** Prueba Duncan para identificar las diferencias de pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

pH								
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$						Interpretación	
	1	2	3	4	5	6	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 48 Fina	4.93						4.93 ± 0.03 a	
Tiempo 48 Gruesa		4.98					4.98 ± 0.02 b	
Tiempo 24 Fina			5.19				5.19 ± 0.01 c	
Tiempo 24 Gruesa			5.20				5.20 ± 0.01 c	
Tiempo 18.5 Fina				6.15			6.15 ± 0.01 d	
Tiempo 18.5 Gruesa					6.19		6.19 ± 0.01 e	
Tiempo 0 Gruesa						7.18	7.18 ± 0.02 f	
Tiempo 0 Fina						7.21	7.21 ± 0.01 f	

**Cuadro 10.2.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del pH en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

pH							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.00	2	0.00	0.80	3.59	6.11	NS
Error	0.01	17	0.00				

## 10.3 ANÁLISIS QUÍMICOS

### 10.3.1 Composición proximal

**Cuadro 10.3.1.1:** Porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente en la misma columna, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

(a) carbohidratos		$\alpha = 0.05$	(b) proteína		$\alpha = 0.01$
Tiempo 0 Gruesa	82.1 $\pm$ 0.8 a		Tiempo 24	9.8 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 48 Gruesa	82.3 $\pm$ 0.2 a		Tiempo 18.5	9.9 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 24 Gruesa	82.4 $\pm$ 0.4 a		Tiempo 48	10.1 $\pm$ 0.2 a	
Tiempo 18.5 Gruesa	82.6 $\pm$ 0.3 a		Tiempo 0	11.4 $\pm$ 0.3 b	
Tiempo 0 Fina	82.7 $\pm$ 0.7 a				
Tiempo 48 Fina	84.5 $\pm$ 0.1 b		<b>Proteína</b>		$\alpha = 0.01$
Tiempo 18.5 Fina	84.7 $\pm$ 0.2 b		Fina	10.3 $\pm$ 0.7 a	
Tiempo 24 Fina	84.7 $\pm$ 0.1 b		Gruesa	10.3 $\pm$ 0.6 a	

(c) grasa		$\alpha = 0.05$	(d) fibra		$\alpha = 0.01$	(e) ceniza		$\alpha = 0.01$
Tiempo 18.5 Fina	3.1 ± 0.1 a		Tiempo 48 Fina	1.1 ± 0.0 a		Tiempo 18.5	1.2 ± 0.1 a	
Tiempo 24 Fina	3.2 ± 0.0 a		Tiempo 0 Fina	1.2 ± 0.1 a		Tiempo 24	1.2 ± 0.1 a	
Tiempo 48 Fina	3.2 ± 0.0 a		Tiempo 24 Fina	1.2 ± 0.0 a		Tiempo 48	1.2 ± 0.1 a	
Tiempo 0 Fina	3.3 ± 0.2 a		Tiempo 18.5 Fina	1.2 ± 0.0 a		Tiempo 0	1.3 ± 0.1 b	
Tiempo 0 Gruesa	3.8 ± 0.4 b		Tiempo 0 Gruesa	1.4 ± 0.2 a				
Tiempo 18.5 Gruesa	4.3 ± 0.2 c		Tiempo 48 Gruesa	1.7 ± 0.0 b		<b>Ceniza</b>		$\alpha = 0.01$
Tiempo 24 Gruesa	4.3 ± 0.2 c		Tiempo 18.5 Gruesa	2.1 ± 0.0 c		Fina	1.2 ± 0.1 a	
Tiempo 48 Gruesa	4.4 ± 0.2 c		Tiempo 24 Gruesa	2.1 ± 0.4 d		Gruesa	1.3 ± 0.1 b	

**Cuadro 10.3.1.2:** Análisis de varianza del porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) carbohidratos</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	5.6	3	1.9	9.8	3.24	5.29	**
Tipo	19.6	1	19.6	102.6	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	3.0	3	1.0	5.2	3.24	5.29	*
Error	3.1	16	.2				
Total	166407.6	24					

<b>(b) proteína</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	9.3	3	3.1	100.6	3.24	5.29	**
Tipo	0.0	1	0.0	0.6	4.49	8.53	NS
Tiempo x Tipo	0.2	3	0.1	2.5	3.24	5.29	NS
Error	0.5	16	0.0				
Total	2558.8	24					



<b>(c) grasa</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	0.2	3	0.1	1.4	3.24	5.29	NS
Tipo	6.0	1	6.0	163.6	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	0.5	3	0.2	5.0	3.24	5.29	*
Error	0.6	16	0.0				
Total	335.2	24					

<b>(d) fibra</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	0.5	3	0.2	7.1	3.24	5.29	**
Tipo	2.6	1	2.6	102.2	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	0.4	3	0.1	5.4	3.24	5.29	**
Error	0.4	16	0.0				
Total	166407.6	24					

<b>(e) ceniza</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	0.1	3	0.0	5.1	3.13	5.01	**
Tipo	0.1	1	0.1	9.7	4.38	8.18	**
Error	0.1	19	0.0				
Total	37.1	24					

**Cuadro 10.3.1.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en el porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(a) carbohidratos</b>				
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.05$		Interpretación	
	1	2	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Gruesa	82.1		82.1 ± 0.8 a	
Tiempo 48 Gruesa	82.3		82.3 ± 0.2 a	
Tiempo 24 Gruesa	82.4		82.4 ± 0.4 a	
Tiempo 18.5 Gruesa	82.6		82.6 ± 0.3 a	
Tiempo 0 Fina	82.7		82.7 ± 0.7 a	
Tiempo 48 Fina		84.5	84.5 ± 0.1 b	
Tiempo 18.5 Fina		84.7	84.7 ± 0.2 b	
Tiempo 24 Fina		84.7	84.7 ± 0.1 b	

<b>(b) proteína</b>				
Tiempo	$\alpha = 0.01$		Interpretación	
	1	2	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 24	9.8		9.8 ± 0.1 a	
Tiempo 18.5	9.9		9.9 ± 0.1 a	
Tiempo 48	10.1		10.1 ± 0.2 a	
Tiempo 0		11.4	11.4 ± 0.3 b	

<b>(b) proteína</b>		Interpretación	
Tipo	$\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Fina		10.3 ± 0.7 a	
Gruesa		10.3 ± 0.6 a	

<b>(c) grasa</b>					
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.05$			Interpretación	
	1	2	3	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 18.5 Fina	3.1			3.1 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 24 Fina	3.2			3.2 $\pm$ 0.0 a	
Tiempo 48 Fina	3.2			3.2 $\pm$ 0.0 a	
Tiempo 0 Fina	3.3			3.3 $\pm$ 0.2 a	
Tiempo 0 Gruesa		3.8		3.8 $\pm$ 0.4 b	
Tiempo 18.5 Gruesa			4.3	4.3 $\pm$ 0.2 c	
Tiempo 24 Gruesa			4.3	4.3 $\pm$ 0.2 c	
Tiempo 48 Gruesa			4.4	4.4 $\pm$ 0.2 c	

<b>(d) fibra</b>						
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 48 Fina	1.1				1.1 $\pm$ 0 a	
Tiempo 0 Fina	1.2				1.2 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 24 Fina	1.2				1.2 $\pm$ 0 a	
Tiempo 18.5 Fina	1.2				1.2 $\pm$ 0 a	
Tiempo 0 Gruesa	1.4	1.4			1.4 $\pm$ 0.2 a	
Tiempo 48 Gruesa		1.7	1.7		1.7 $\pm$ 0 b	
Tiempo 18.5 Gruesa			2.1	2.1	2.1 $\pm$ 0 c	
Tiempo 24 Gruesa				2.1	2.1 $\pm$ 0.4 d	

<b>(e) ceniza</b>				
Tiempo	$\alpha = 0.01$		Interpretación	
	1	2	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 18.5	1.2		1.2 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 24	1.2	1.2	1.2 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 48	1.2	1.2	1.2 $\pm$ 0.1 a	
Tiempo 0		1.3	1.3 $\pm$ 0.1 b	

<b>(e) ceniza</b>		Interpretación	
Tipo	$\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Fina		1.2 $\pm$ 0.1 a	
Gruesa		1.3 $\pm$ 0.1 b	

**Cuadro 10.3.1.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del porcentaje (g/g de masa), en base seca de los componentes: (a) carbohidratos, (b) proteína, (c) grasa, (d) fibra y (e) ceniza, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h): 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) carbohidratos</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.2	2	0.1	0.3	3.59	6.11	NS
Error	5.8	17	0.3				
<b>(b) proteína</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.1	2	0.0	1.3	3.55	6.01	NS
Error	0.6	18	0.0				
<b>(c) grasa</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.1	2	0.1	1.0	3.49	5.85	NS
Error	1.2	20	0.1				
<b>(d) fibra</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.1	2	0.0	0.9	3.59	6.11	NS
Error	0.7	17	0.0				
<b>(e) ceniza</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.0	2	0.0	1.0	3.59	6.11	NS
Error	0.1	17	0.0				

### 10.3.2 Carbohidratos solubles

**Cuadro 10.3.2.1:** Concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Valores con letra diferente en la misma columna, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

(a) carbohidratos totales (solubles)		$\alpha = 0.01$	(b) almidón (soluble)		$\alpha = 0.01$	(c) carbohidratos reductores (solubles)		$\alpha = 0.01$
Tiempo 48 Fina	20.9 $\pm$ 0.2 a		Tiempo 48 Fina	9.1 $\pm$ 0.7 a		Tiempo 0 Gruesa	0.9 $\pm$ 0.0 a	
Tiempo 18.5 Gruesa	21.6 $\pm$ 0.5 b		Tiempo 18.5 Gruesa	11.9 $\pm$ 0.0 b		Tiempo 0 Fina	1.2 $\pm$ 0.0 b	
Tiempo 0 Fina	22.8 $\pm$ 0.2 c		Tiempo 24 Fina	15.8 $\pm$ 0.2 c		Tiempo 18.5 Gruesa	1.6 $\pm$ 0.0 c	
Tiempo 48 Gruesa	28.3 $\pm$ 0.3 d		Tiempo 0 Gruesa	16.7 $\pm$ 0.1 d		Tiempo 24 Gruesa	2.0 $\pm$ 0.0 d	
Tiempo 0 Gruesa	29.8 $\pm$ 0.2 e		Tiempo 48 Gruesa	17.4 $\pm$ 0.4 d		Tiempo 48 Gruesa	2.0 $\pm$ 0.0 d	
Tiempo 24 Fina	31.4 $\pm$ 0.3 f		Tiempo 0 Fina	18.3 $\pm$ 0.3 e		Tiempo 24 Fina	2.4 $\pm$ 0.0 e	
Tiempo 24 Gruesa	31.8 $\pm$ 0.4 f		Tiempo 24 Gruesa	22.5 $\pm$ 0.3 f		Tiempo 48 Fina	2.8 $\pm$ 0.0 f	
Tiempo 18.5 Fina	60.9 $\pm$ 0.1 g		Tiempo 18.5 Fina	23.1 $\pm$ 0.1 f		Tiempo 18.5 Fina	2.8 $\pm$ 0.0 f	

**Cuadro 10.3.2.2:** Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

(a) carbohidratos totales (solubles)							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	1008.2	3	336.1	3388.9	3.24	5.29	**
Tipo	223.3	1	223.3	2251.9	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	2243.9	3	748.0	7542.4	3.24	5.29	**
Error	1.6	16	0.1				
Total	26469.4	24					

<b>(b) carbohidratos reductores (solubles)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	6.6	3	2.2	4230.2	3.24	5.29	**
Tipo	2.9	1	2.9	5664.3	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	0.9	3	0.3	570.7	3.24	5.29	**
Error	0.0	16	0.0				
Total	102.2	24					

<b>(c) almidón (soluble)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	115.2	3	38.4	331.9	3.24	5.29	**
Tipo	1.5	1	1.5	13.2	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	362.3	3	120.8	1043.8	3.24	5.29	**
Error	1.9	16	0.1				
Total	7293.0	24					

**Cuadro 10.3.2.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(a) carbohidratos totales (solubles)</b>									
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$							Interpretación	
	1	2	3	4	5	6	7	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 48 Fina	20.9							20.9 ± 0.2	a
Tiempo 18.5 Gruesa		21.6						21.6 ± 0.5	b
Tiempo 0 Fina			22.8					22.8 ± 0.2	c
Tiempo 48 Gruesa				28.3				28.3 ± 0.3	d
Tiempo 0 Gruesa					29.8			29.8 ± 0.2	e
Tiempo 24 Fina						31.4		31.4 ± 0.3	f
Tiempo 24 Gruesa						31.8		31.8 ± 0.4	f
Tiempo 18.5 Fina							60.9	60.9 ± 0.1	g

<b>(b) carbohidratos reductores (solubles)</b>								
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$						Interpretación	
	1	2	3	4	5	6	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Guesa	0.9						0.9 ± 0.0 a	
Tiempo 0 Fina		1.2					1.2 ± 0.0 b	
Tiempo 18.5 Guesa			1.6				1.6 ± 0.0 c	
Tiempo 24 Guesa				2.0			2.0 ± 0.0 d	
Tiempo 48 Guesa				2.0			2.0 ± 0.0 d	
Tiempo 24 Fina					2.4		2.4 ± 0.0 e	
Tiempo 48 Fina						2.8	2.8 ± 0.0 f	
Tiempo 18.5 Fina						2.8	2.8 ± 0.0 f	

<b>(c) almidón (soluble)</b>								
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$						Interpretación	
	1	2	3	4	5	6	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 48 Fina	9.1						9.1 ± 0.7 a	
Tiempo 18.5 Guesa		11.9					11.9 ± 0.0 b	
Tiempo 24 Fina			15.8				15.8 ± 0.2 c	
Tiempo 0 Guesa				16.7			16.7 ± 0.1 d	
Tiempo 48 Guesa				17.4			17.4 ± 0.4 d	
Tiempo 0 Fina					18.3		18.3 ± 0.3 e	
Tiempo 24 Guesa						22.5	22.5 ± 0.3 f	
Tiempo 18.5 Fina						23.1	23.1 ± 0.1 f	

**Cuadro 10.3.2.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración de carbohidratos solubles (mg/g de masa): (a) carbohidratos totales, (b) almidón y (c) carbohidratos reductores, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(b) carbohidratos totales (solubles)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.0	2	0.0	0.0	3.59	6.11	NS
Error	2245.5	17	132.1				

<b>(b) carbohidratos reductores (solubles)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.0	2	0.0	0.0	3.59	6.11	NS
Error	0.9	17	0.1				

<b>(c) almidón (soluble)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.3	2	0.1	0.0	3.59	6.11	NS
Error	363.8	17	21.4				



### 10.3.3 Productos de fermentación

**Cuadro 10.3.3.1:** Concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente en la misma columna, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

(a) sacarosa		$\alpha = 0.01$	(b) fructosa		$\alpha = 0.01$	(c) %m/m ácido láctico		$\alpha = 0.01$
Tiempo 24		0.0 $\pm$ 0.0 a	Tiempo 24		0.0 $\pm$ 0.0 a	Tiempo 0 Fina		0.0 $\pm$ 0.0 a
Tiempo 48		2.3 $\pm$ 0.0 b	Tiempo 48		0.0 $\pm$ 0.0 a	Tiempo 0 Gruesa		0.0 $\pm$ 0.0 a
Tiempo 18.5		2.3 $\pm$ 0.0 b	Tiempo 0		1.6 $\pm$ 0.0 b	Tiempo 18.5 Fina		0.3 $\pm$ 0.0 b
Tiempo 0		2.5 $\pm$ 0.0 c	Tiempo 18.5		1.7 $\pm$ 0.0 c	Tiempo 18.5 Gruesa		0.3 $\pm$ 0.0 b
						Tiempo 24 Fina		0.6 $\pm$ 0.0 c
						Tiempo 24 Gruesa		0.9 $\pm$ 0.0 d
Fina		1.8 $\pm$ 1.1 a	Fina		0.8 $\pm$ 0.9 a	Tiempo 48 Gruesa		1.1 $\pm$ 0.1 e
Gruesa		1.8 $\pm$ 1.1 a	Gruesa		0.8 $\pm$ 0.9 a	Tiempo 48 Fina		1.3 $\pm$ 0.0 f

**Cuadro 10.3.3.2:** Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

(a) sacarosa							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	25.2	3	8.4	8104.6	3.24	5.29	**
Tipo	0.0	1	0.0	2.1	4.49	8.53	NS
Tiempo x Tipo	0.0	3	0.0	1.1	3.24	5.29	NS
Error	0.0	16	0.0				
Total	100.2	24					

<b>(b) fructosa</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	16.5	3	5.5	11462.2	3.13	5.01	**
Tipo	0.0	1	0.0	1.5	4.38	8.18	NS
Error	0.0	19	0.0				
Total	33.0	24					

<b>(c) %m/m ácido láctico</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	5.2	3	1.7	821.3	3.24	5.29	**
Tipo	0.0	1	0.0	1.2	4.49	8.53	NS
Tiempo x Tipo	0.2	3	0.1	24.0	3.24	5.29	**
Error	0.0	16	0.0				
Total	13.3	24					

**Cuadro 10.3.3.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(a) sacarosa</b>					
Tiempo	$\alpha = 0.01$			Interpretación	
	1	2	3	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 24	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 48		2.3		2.3 ± 0.0 b	
Tiempo 18.5		2.3		2.3 ± 0.0 b	
Tiempo 0			2.5	2.5 ± 0.0 c	

<b>(a) sacarosa</b>		Interpretación	
Tipo	$\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Fina		1.8 ± 1.1 a	
Gruesa		1.8 ± 1.1 a	

<b>(b) fructosa</b>					
Tiempo	$\alpha = 0.01$			Interpretación	
	1	2	3	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 24	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 48	0.0			0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 0		1.6		1.6 ± 0.0 b	
Tiempo 18.5			1.7	1.7 ± 0.0 c	

<b>(b) fructosa</b>		Interpretación	
Tipo	$\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Fina		0.8 ± 0.9 a	
Gruesa		0.8 ± 0.9 a	

<b>(c) %m/m ácido láctico</b>								
Tiempo x Tipo	$\alpha = 0.01$						Interpretación	
	1	2	3	4	5	6	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0 Fina	0.0						0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 0 Gruesa	0.0						0.0 ± 0.0 a	
Tiempo 18.5 Fina		0.3					0.3 ± 0.0 b	
Tiempo 18.5 Gruesa		0.3					0.3 ± 0.0 b	
Tiempo 24 Fina			0.6				0.6 ± 0.0 c	
Tiempo 24 Gruesa				0.9			0.9 ± 0.0 d	
Tiempo 48 Gruesa					1.1		1.1 ± 0.1 e	
Tiempo 48 Fina						1.3	1.3 ± 0.0 f	

**Cuadro 10.3.3.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración de carbohidratos (mg/g de masa) y porcentaje de ácido láctico (g/g masa): (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) ácido láctico, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) sacarosa</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repeticion	0.0	2	0.0	1.0	3.59	6.11	NS
Error	0.0	17	0.0				

<b>(b) fructosa</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repeticion	0.0	2	0.0	0.7	3.59	6.11	NS
Error	0.0	17	0.0				

<b>(c) %m/m ácido láctico</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repeticion	0.0	2	0.0	0.1	3.55	6.01	NS
Error	0.2	18	0.0				

### 10.3.4 Fibra (pared celular vegetal)

**Cuadro 10.3.4.1:** Porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

<b>fibra (pared celular)</b>		<b><math>\alpha = 0.01</math></b>
Tiempo 0	6.0 $\pm$ 0.8 a	
Tiempo 18.5	6.5 $\pm$ 0.7 a	
Tiempo 24	6.9 $\pm$ 1.3 a	
Tiempo 48	7.5 $\pm$ 1.0 a	
<b>fibra (pared celular)</b>		<b><math>\alpha = 0.01</math></b>
Fina	5.9 $\pm$ 0.5 a	
Gruesa	7.5 $\pm$ 0.9 b	

**Cuadro 10.3.4.2:** Análisis de varianza del porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(b) fibra (pared celular)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	7.8	3	2.6	18.0	3.24	5.29	**
Tipo	15.5	1	15.5	107.3	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	1.3	3	0.4	2.9	3.24	5.29	NS
Error	2.3	16	0.1				
Total	1114.6	24					

**Cuadro 10.3.4.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en el porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(b) fibra (pared celular)</b>			
Tiempo	$\alpha = 0.01$	Interpretación	
	1	Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0	6.0	6.0 ± 0.8 a	
Tiempo 18.5	6.5	6.5 ± 0.7 a	
Tiempo 24	6.9	6.9 ± 1.3 a	
Tiempo 48	7.5	7.5 ± 1.0 a	

<b>(b) fibra (pared celular)</b>		Interpretación	
Tipo	$\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Fina		5.9 ± 0.5 a	
Gruesa		7.5 ± 0.9 b	

**Cuadro 10.3.4.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados del porcentaje (m/m) de fibra (pared celular vegetal), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(b) fibra (pared celular)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	0.5	2	0.2	1.3	4.45	8.4	NS
Error	3.1	17	0.2				

### 10.3.5 Xilosa (hemicelulosa) y glucosa (celulosa)

**Cuadro 10.3.5.1:** Concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente en la misma columna, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

(a) hemicelulosa (xilosa) $\alpha = 0.01$		(b) celulosa (glucosa) $\alpha = 0.01$	
TIEMPO 48 GRUESA	78.2 $\pm$ 0.9 a	TIEMPO 24 FINA	124.4 $\pm$ 5.0 a
TIEMPO 24 FINA	82.8 $\pm$ 1.3 b	TIEMPO 0 FINA	133.1 $\pm$ 4.7 a
TIEMPO 0 FINA	83 $\pm$ 0.9 b	TIEMPO 18.5 FINA	133.1 $\pm$ 3.1 a
TIEMPO 48 FINA	83.6 $\pm$ 1.7 b	TIEMPO 48 GRUESA	134.9 $\pm$ 4.5 a
TIEMPO 18.5 FINA	84.1 $\pm$ 0.5 b	TIEMPO 48 FINA	141.5 $\pm$ 6.9 a
TIEMPO 24 GRUESA	88.5 $\pm$ 4.0 c	TIEMPO 24 GRUESA	147.5 $\pm$ 31.4 a
TIEMPO 18.5 GRUESA	95.3 $\pm$ 2.3 d	TIEMPO 0 GRUESA	199.7 $\pm$ 3.7 b
TIEMPO 0 GRUESA	98.1 $\pm$ 7.9 d	TIEMPO 18.5 GRUESA	201.4 $\pm$ 15.4 b

**Cuadro 10.3.5.2:** Análisis de varianza de la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

(a) hemicelulosa (xilosa)							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	350.4	3	116.8	10.3	3.24	5.29	**
Tipo	266.6	1	266.6	23.4	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	353.5	3	117.8	10.4	3.24	5.29	**
Error	181.9	16	11.4				
Total	181581.9	24					

<b>(b) celulosa (glucosa)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	5333.2	3	1777.7	10.5	3.24	5.29	**
Tipo	8587.6	1	8587.6	50.5	4.49	8.53	**
Tiempo x Tipo	5930.5	3	1976.8	11.6	3.24	5.29	**
Error	2718.5	16	169.9				
Total	576731.3	24					

**Cuadro 10.3.5.3:** Prueba Duncan para identificar las diferencias en la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

<b>(a) hemicelulosa (xilosa)</b>						
TIEMPO X TIPO	$\alpha = 0.01$				Interpretación	
	1	2	3	4	Promedio	Desviación Std.
TIEMPO 48 GRUESA	78.2				78.2 $\pm$ 0.9 a	
TIEMPO 24 FINA	82.8	82.8			82.8 $\pm$ 1.3 b	
TIEMPO 0 FINA	83.0	83.0			83 $\pm$ 0.9 b	
TIEMPO 48 FINA	83.6	83.6			83.6 $\pm$ 1.7 b	
TIEMPO 18.5 FINA	84.1	84.1			84.1 $\pm$ 0.5 b	
TIEMPO 24 GRUESA		88.5	88.5		88.5 $\pm$ 4.0 c	
TIEMPO 18.5 GRUESA			95.3	95.3	95.3 $\pm$ 2.3 d	
TIEMPO 0 GRUESA				98.1	98.1 $\pm$ 7.9 d	

<b>(b) celulosa (glucosa)</b>				
TIEMPO X TIPO	$\alpha = 0.01$		Interpretación	
	1	2	Promedio	Desviación Std.
TIEMPO 24 FINA	124.4		124.4 ± 5.0 a	
TIEMPO 0 FINA	133.1		133.1 ± 4.7 a	
TIEMPO 18.5 FINA	133.1		133.1 ± 3.1 a	
TIEMPO 48 GRUESA	134.9		134.9 ± 4.5 a	
TIEMPO 48 FINA	141.5		141.5 ± 6.9 a	
TIEMPO 24 GRUESA	147.5		147.5 ± 31.4 a	
TIEMPO 0 GRUESA		199.7	199.7 ± 3.7 b	
TIEMPO 18.5 GRUESA		201.4	201.4 ± 15.4 b	

**Cuadro 10.3.5.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la concentración (mg/g de pared celular vegetal): (a) hemicelulosa (xilosa) y (b) celulosa (glucosa), de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 18.5, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

<b>(a) hemicelulosa (xilosa)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	33.8	2	16.9	0.6	3.59	6.11	NS
Error	501.6	17	29.5				

<b>(b) celulosa (glucosa)</b>							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Repetición	323.1	2	161.5	0.3	3.59	6.11	NS
Error	8325.9	17	489.8				



## 10.4 Gramos por fracción

**Cuadro 10.4.1:** Valores de gramos en las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Se muestran promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Valores con letra diferente, son significativamente diferentes. Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

gramos por fracción $\alpha = 0.01$	
Tiempo 0	50.00 $\pm$ 15.2 a
Tiempo 24	50.00 $\pm$ 17.7 a
Tiempo 48	50.00 $\pm$ 16.8 a
gramos por fracción $\alpha = 0.01$	
Gruesa	35.1 $\pm$ 2.8 b
Fina	64.9 $\pm$ 2.8 a

**Cuadro 10.4.2:** Análisis de varianza de la cantidad en gramos, de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

gramos por fracción							
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación
					0.05	0.01	
Tiempo	0.0	2	0.0	0.0	3.74	6.51	NS
Tipo	3994.4	1	3994.4	444.9	4.60	8.86	**
Error	125.7	14	9.0				
Total	49120.1	18					

**Cuadro 10.4.3** Prueba Duncan para identificar las diferencias de la cantidad en gramos de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

gramos por fracción			
Tiempo	$\alpha = 0.01$	Interpretación	
		Promedio	Desviación Std.
Tiempo 0	50.0	50.00 $\pm$ 15.2 a	
Tiempo 24	50.0	50.00 $\pm$ 17.7 a	
Tiempo 48	50.0	50.00 $\pm$ 16.8 a	

gramos por fracción	Interpretación	
Tipo $\alpha = 0.01$	Promedio	Desviación Std.
Gruesa	35.1 $\pm$ 2.8 a	
Fina	64.9 $\pm$ 2.8 b	

**Cuadro 10.4.4:** Análisis de varianza de las repeticiones en los resultados de la cantidad en gramos de las fracciones fina y gruesa de las masas de pozol en los tiempos (h) 0, 24 y 48 de fermentación a 30°C. Diferencia altamente significativa (\*\*), diferencia significativa (\*), no existe diferencia significativa (NS).

gramos por fracción								
Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	f tablas ( $\alpha$ )		Interpretación	
					0.05	0.01		
Repetición	0.0	2	0.0	0.0	3.89	6.93	NS	
Error	125.7	12	10.5					