

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PROCESO DE
FERMENTACIÓN DE MAÍZ (*Zea mays*) GERMINADO PARA LA OBTENCIÓN
DE UNA BEBIDA CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS.

POR

IRIS MARGARITA GARCÍA NÚÑEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACION EN ALIMENTOS

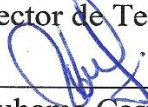
2023

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PROCESO DE
FERMENTACIÓN CONTROLADO DE MAÍZ GERMINADO
PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA CON
CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS.**

Comité de Tesis




Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Director de Tesis



Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández
Secretario



Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Vocal



Dr. Abelardo Chávez Montes
Vocal

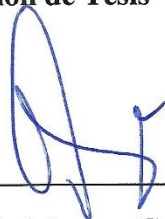


Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PROCESO DE
FERMENTACIÓN CONTROLADO DE MAÍZ GERMINADO
PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA CON
CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS.**


Dirección de Tesis



Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Director



Dra. Yolanda Arlette Santacruz López
Director externo



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la Universidad Autónoma de Nuevo León y Conacyt por el apoyo económico para el desarrollo de esta investigación y por las becas de colegiatura y sostenimiento otorgadas. También agradezco al ITESM por aceptarme de estancia y permitirme el acceso a su laboratorio de alto nivel.

Con mi asesor, el Dr. Carlos Amaya, estoy sumamente agradecida por todo el apoyo que me dado, aun desde mi tesis de licenciatura y hasta este momento siempre ha sido para mí como un padre académico. No tengo palabras para agradecerle por todo su apoyo, sus consejos y su guía. También es gracias a su arduo trabajo que nunca faltaron los materiales y reactivos para mis experimentos.

Gracias a la Dra. Arlette Santacruz porque pese a sus múltiples ocupaciones se hizo espacio para guiarme y apoyarme con dudas y comentarios. También le agradezco que fuera mi vínculo con el ITESM y me apoyara con el préstamo de equipos y materiales para realizar los experimentos.

A mis asesores, Dra. Sandra Castillo, Dra. Katiushka Arévalo y Dr. Carlos Aguilera les agradezco sus enriquecedores comentarios y sugerencias. Y al Dr. Sergio Serna por su gran ayuda en la conceptualización de varios puntos importantes de mi tesis

Gracias a Jenny Rodriguez, Cristina y Felipe Lopez por su apoyo en el laboratorio, por las técnicas que me enseñaron y compartir conmigo su experiencia y conocimientos. Agradezco también a los muchachos de voluntariado, servicio social y becarios por su entusiasmo por aprender y su apoyo en el laboratorio.

A mis papas y mis hermanas, por ser mi apoyo incondicional desde siempre. A mis amigos Cintya Soria, Sergio Cardona por sus ánimos y por escucharme cuando los experimentos no salían.

*A Ismael, por su cariño, comprensión y ser mi apoyo en los momentos difíciles y
mi compañero en los momentos felices.*

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Maíz.....	3
2.2. Germinación y malteado	4
2.2.1. Cambios en la composición del grano.....	5
2.3. Fermentación	7
2.3.1. Importancia tecnológica y nutricional.....	8
2.3.2. Alimentos fermentados a base de maíz	10
2.4. Probióticos.....	14
2.4.1. Efectos de los probióticos a la salud	15
2.4.1.1. Producción de ácidos grasos de cadena corta	15
2.4.2. Alimentos con probióticos.....	16
2.4.3. Evaluación de microorganismos probióticos.....	17
2.4.4. Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO	24
6. CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE MICROORGANISMOS COMO PROBIÓTICOS	25
6.1. Resumen	25
6.2. Introducción.....	25
6.3. Materiales y Métodos	27
6.3.1. Cepas y condiciones de cultivo	27

6.3.2.	Resistencia a fluidos gástricos e intestinales simulados.....	27
6.3.3.	Sensibilidad a antibióticos.....	28
6.3.4.	Adhesión a las células Caco-2.....	29
6.3.5.	Fermentación de prebióticos.....	30
6.3.6.	Formación de ácidos grasos de cadena corta.....	32
6.3.7.	Análisis estadístico	33
6.4.	Resultados	33
6.4.1.	Resistencia a fluidos gástricos e intestinales simulados.....	33
6.4.2.	Sensibilidad a los antibióticos.....	34
6.4.3.	Adhesión a las células CaCo-2.....	37
6.4.4.	Fermentación de prebióticos	37
6.4.5.	Producción de ácidos grasos de cadena corta	40
6.5.	Discusión	43
6.5.1.	Resistencia a condiciones gástricas e intestinales	43
6.5.2.	Susceptibilidad a antibióticos.....	44
6.5.3.	Capacidad de adhesión a células CaCo-2.....	45
6.5.4.	Fermentación de fibras	46
6.5.5.	Formación de ácidos grasos de cadena corta.....	47
6.6.	Conclusiones	49
7.	CAPÍTULO 2. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO Y TIEMPO DE GERMINACIÓN PARA OBTENER GERMINADO DE MAÍZ SANITARIO, NUTRITIVO Y FERMENTABLE	51
7.1.	Resumen	51
7.2.	Introducción.....	51
7.3.	Material y Métodos	53
7.3.1.	Material biológico	53
7.3.2.	Caracterización del grano	53
7.3.2.1.	Índice de flotación	54
7.3.2.2.	Peso hectolitrico, peso de mil granos y dimensiones.....	54
7.3.3.	Absorción de agua	55
7.3.4.	Definición de protocolo de sanitizado.....	55
7.3.5.	Pruebas de germinación.....	55
7.3.6.	Análisis nutrimental	56

7.3.7.	Determinación de azúcares reductores	56
7.3.8.	Determinación de amino nitrógeno libre.....	56
7.3.9.	Actividad enzimática.....	57
7.3.9.1.	Actividad α -amilasa.....	57
7.4.	Resultados	58
7.4.1.	Caracterización del grano.....	58
7.4.2.	Absorción de agua.....	58
7.4.3.	Reducción de carga microbiana en los germinados	60
7.4.4.	Cambios físicos y nutrimentales durante la germinación.....	63
7.4.5.	Cambios en la actividad enzimática durante la germinación	65
7.5.	Discusión	66
7.5.1.	Características biofísicas de los granos	66
7.5.2.	Efecto de la temperatura en la absorción de agua de los granos	67
7.5.3.	Reducción de la carga microbiana en los germinados.....	68
7.5.4.	Cambios nutrimentales en los germinados	69
7.5.5.	Cambios bioquímicos durante la germinación	70
7.6.	Conclusiones	71
8.	CAPÍTULO 3. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MAÍZ CON UN MICROORGANISMO PROBIÓTICO.....	72
8.1.	Resumen	72
8.2.	Introducción.....	72
8.3.	Material y métodos.....	74
8.3.1.	Procesado previo del maíz.....	74
8.3.2.	Elaboración de harina de maíz germinado	74
8.3.3.	Preparación de suspensiones de maíz previo a su fermentación	74
8.3.4.	Selección del microorganismo	75
8.3.5.	Optimización del tiempo y pH inicial de la fermentación.....	75
8.3.6.	Validación del modelo y caracterización del fermento	75
8.3.7.	Análisis estadístico	76
8.4.	Resultados	76
8.4.1.	Fase de licuefacción	76
8.4.2.	Fermentación preliminar con <i>L. plantarum</i> V3 o <i>L. acidophilus</i> La3.....	77
8.4.3.	Optimización de la fermentación.....	80

8.4.4.	Caracterización del fermento.....	91
8.5.	Discusión	93
8.5.1.	Licuefacción	93
8.5.2.	Fermentaciones preliminares.....	94
8.5.3.	Optimización del pH inicial y tiempo de fermentación	94
8.5.3.1.	Proteína	94
8.5.3.2.	Probióticos	96
8.5.3.3.	AGCC	97
8.5.4.	Condiciones óptimas compuestas.....	99
8.5.5.	Validación del modelo.....	100
8.5.6.	Caracterización del fermento.....	100
8.5.6.1.	Caracterización fisicoquímica y microbiológica	100
8.5.6.2.	Caracterización nutricional	101
8.5.6.3.	Contenido de AGCC.....	102
8.6.	Conclusiones	104
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	106
10.	PERSPECTIVAS	107
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	108
	RESUMEN BIOGRÁFICO	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alimentos más producidos en el mundo, promedio 1994 – 2019 (FAOSTAT, 2018).	3
Figura 2. Fases de la germinación de los granos desde una perspectiva a) metabólica y b) física.	5
Figura 3. Diagrama de la clasificación de los alimentos probióticos (traducido de Vijaya et al. 2015).....	17
Figura 4. Factores a evaluar para la selección de probióticos con aplicación en alimentos.	19
Figura 5. (A) Establecimiento de consorcios sintróficos en el ecosistema del colon humano. (B) Principales rutas metabólicas bacterianas de la fermentación de oligosacáridos y de alimentación metabólica cruzada. Tomado de Candela et al. 2010.....	21
Figura 6. Adhesión de las bacterias <i>Lactobacillus plantarum</i> V3, <i>L. acidophilus</i> La3, <i>L. casei</i> B93, <i>L. plantarum</i> B112, <i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. acidophilus</i> 56 y <i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311 (control) a células de epitelio intestinal humano Caco-2. Las medias sin letras en común dentro de la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).	37
Figura 7. Cinética del crecimiento durante la fermentación de dextrosa (control), inulina o fibra de maíz soluble (SCF) por <i>Lactobacillus plantarum</i> V3 (a) y <i>Lactobacillus acidophilus</i> La3 (b). Tratamientos con letras diferentes significa que son significativamente diferentes para el mismo tiempo ($p < 0.05$).	39
Figura 8. Tolava de llenado de granos empleada para determinar el peso hectolitrico de granos.	54
Figura 9. Cinética de absorción de humedad del grano de maíz durante la inmersión en agua a 25 °C.	59
Figura 10. Cinética de absorción de humedad del grano de maíz durante la inmersión en agua a diferentes temperaturas.	60
Figura 11. Carga microbiana de maíz sin ningún tratamiento (S/T), maíz sanitizado con cloro (a) o ácido peracético (b) a diferentes concentraciones y tiempos de	

contacto; y maíz sanitizado del mismo modo y puesto en remojo por 41 y 62 h.....	62
Figura 12. Cambios en el contenido de azúcares reductores y nitrógeno amino libre durante la germinación de maíz (bs). Medias que no comparten letra entre diferentes tiempos son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).	65
Figura 13. Cambios en el contenido de α -amilasa durante la germinación de maíz (bs). Medias que no comparten letra entre diferentes tiempos son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).	66
Figura 14. Cinéticas de fermentación de maíz germinado con <i>Lactobacillus plantarum</i> V3, <i>L. acidophilus</i> La3 o sin inóculo (control).	78
Figura 15. Contenido de proteína en maíz, harina de maíz germinado y maíz germinado y fermentado a diferentes tiempos sin inóculo (Control) con <i>L. plantarum</i> V3 (V3) o con <i>L. acidophilus</i> La3 (La3). Medias que no comparten letra son significativamente diferentes.	79
Figura 16. Cambio en la concentración de ácidos grasos de cadena corta: acético (a), butírico (b), isovalérico (c), valérico (d), isocaproico (e), y caproico (f) durante la fermentación de germinado de maíz por <i>L. plantarum</i> V3, <i>L. acidophilus</i> La3 o sin inocular (control).	82
Figura 17. Superficies de respuesta y graficas de contornos mostrando los efectos del pH inicial y tiempo de fermentación de maíz germinado en el contenido de probióticos y proteína.....	86
Figura 18. Superficies de respuesta mostrando los efectos del pH inicial y tiempo de fermentación de maíz germinado en el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales y en los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocapróico y caprónico.	87
Figura 19. Condiciones óptimas de tiempo y pH inicial para maximizar el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, proteína y probióticos en la fermentación de maíz germinado.	88
Figura 20. Condiciones óptimas para maximizar el contenido compuesto de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, proteína y probióticos.	89

Figura 21. Condiciones óptimas para maximizar el contenido compuesto de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales y proteína (a) y el contenido compuesto de proteína y probióticos (b) en la fermentación de maíz germinado.....90

Figura 22. Perfil de ácidos grasos de cadena corta en el maíz germinado fermentado....92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bromatológica del grano de maíz por 100 g.	4
Tabla 2. Efectos de la germinación de granos en sus compuestos nutrimentales y fitoquímicos.	5
Tabla 3. Alimentos tradicionales fermentados a base de maíz. Modificada de: Steinkraus 1983; Kohajdova y Karovičová 2007; Haard et al 1999.	11
Tabla 4. Microorganismos aislados de alimentos tradicionales de maíz fermentado.	12
Tabla 5. Microorganismos puestos a prueba, la fuente de donde se obtuvieron y su código asignado.	27
Tabla 6. Composición de los medios de cultivo MRS para la prueba de (g/L).	30
Tabla 7. Reducción logarítmica de bacterias tras su exposición a condiciones gástricas o intestinales in vitro.	34
Tabla 8. Perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias <i>Lactobacillus plantarum</i> V3, <i>L. acidophilus</i> La3, <i>L. casei</i> B93, <i>L. plantarum</i> B112, <i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. acidophilus</i> 56 and <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (control).	36
Tabla 9. Cambios en el pH, acidez y °Brix durante la fermentación de medios MRS con dextrosa, inulina o fibra soluble de maíz (SCF) por <i>Lactobacillus plantarum</i> V3 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> La3.	41
Tabla 10. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (mMol/L) en cinéticas de fermentación de medios MRS con dextrosa, inulina o fibra soluble de maíz (SCF) por dos bacterias ácido lácticas.	42
Tabla 11. Caracterización biofísica de los granos de maíz.	58
Tabla 12. Carga microbiana al inicio y al final del remojo de maíz a 30 °C con diferentes condiciones de filtrado del aire y desinfección del grano.	63
Tabla 13. Desarrollo de los granos de maíz durante la germinación.	64
Tabla 14. Contenido nutrimental del maíz a diferente tiempo de germinación (bs).	64
Tabla 15. Efecto de la licuefacción (40 °C/ 1h) de maíz germinado.	76
Tabla 16. Diseño central compuesto con resultados para optimizar el contenido de probióticos, proteína y ácidos grasos de cadena corta en la fermentación de maíz germinado.	81

Tabla 17. Análisis de Varianza del diseño central compuesto para optimizar el contenido de proteína, probióticos y ácidos grasos de cadena corta totales en la fermentación de maíz germinado.	85
Tabla 18. Características fisicoquímicas de la bebida de maíz germinado y fermentado.	91
Tabla 19. Contenido microbiológico de la bebida de maíz germinado y fermentado al inicio y al final de la fermentación.....	91
Tabla 20. Contenido nutrimental del maíz sin tratamiento, el germinado de maíz y el maíz germinado y fermentado (bs).	92

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

ANL: Amino nitrógeno libre

AOAC: Asociación de Colaboración Analítica Oficial

ATCC: Ácidos grasos de cadena corta

CIMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

FBS: Suero fetal bovino

FDA: Administración de Alimentos y Bebidas de los Estados Unidos

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

MRS: Medio Man Rogosa y Sharpe

NOM: Norma Oficial Mexicana

PBS: Buffer de fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

UFC: Unidades formadoras de colonia

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

RESUMEN

Se buscó desarrollar un proceso de germinación y fermentación del maíz que permitiera obtener una bebida probiótica, inocua y con un mayor contenido de proteína respecto al maíz sin germinar y fermentar. En la primera etapa del proyecto se evaluaron diferentes bacterias ácido lácticas para definir cuáles se pueden considerar probióticas mediante pruebas de la resistencia *in vitro* a fluidos gástricos e intestinales, adhesión a epitelio intestinal, resistencia a antibióticos y posteriormente su capacidad para fermentar fibras alimentarias y producir ácidos grasos de cadena corta. *Lactobacillus plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 fueron las bacterias con mejores características probióticas entre las cepas evaluadas, también fueron capaces de crecer tanto en inulina como en fibra de maíz soluble y fueron capaces de producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC). En la segunda etapa se germinó el maíz durante 5 días a 25 °C, 95% HR en obscuridad para evaluar el cambio en el tiempo del contenido nutrimental, la actividad enzimática y el contenido de azúcares y nitrógeno amino libre, con el objetivo de definir el tiempo de germinación necesario para tener un balance en el contenido nutrimental y la fermentabilidad del maíz. El contenido de proteína y fibra del maíz no presentó cambios significativos con la germinación en comparación con el maíz sin germinar, por otra parte, se aprecia un incremento en el contenido de cenizas y disminución de los lípidos. En general, a las 96 h se cuenta con el mejor balance entre nitrógeno amino libre, azúcares reductores y α -amilasas. Finalmente, en la tercera etapa se optimizaron el tiempo de fermentación y el pH inicial para maximizar el contenido de proteína, probióticos y AGCC mediante metodología de superficie de respuesta. Se encontró que las condiciones óptimas para proteína, probióticos y AGCC fueron de 56.2 h pH 7.0, 47.2 h pH 4.5 y 72.0 h pH 4.6 respectivamente, también se calcularon las condiciones óptimas para diferentes combinaciones de los factores y se eligió la de proteína y probióticos (46.9 h, pH 7.0) debido a su alto valor de deseabilidad compuesta (0.903). Por medio de la fermentación del maíz germinado se consiguió aumentar el contenido de proteína en el maíz germinado en un 30.5% (bs) en comparación con el maíz sin germinar y obtener una bebida inocua con una dosis de bacterias (8.9 Log) mayor a la reglamentaria para considerarse probiótica, además, se alcanzaron concentraciones de AGCC que podrían tener un efecto en la prevención de la diabetes y el control de peso.

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a maize germination and fermentation process that allows to obtain a safe probiotic drink with higher protein content than that in maize without any process. In first stage of the project, different lactic acid bacteria were evaluated to define which of them could be considered probiotics through *in vitro* tests of resistance to gastric and intestinal fluids, adhesion to intestinal epithelium, resistance to antibiotics, and subsequently, their ability to ferment food fibers and to produce short chain fatty acids. *Lactobacillus plantarum* V3 and *L. acidophilus* La3 showed best probiotic characteristics among all strains evaluated, also, they were capable of grow in inulin and soluble corn fiber and to produce short chain fatty acids (SCFA). In the second stage, maize was germinated for 5 days at 25 °C and 95% RH in dark. Changes in nutritional content, amylase activity and sugars and free amino nitrogen contents were evaluated among time, in order to select best time to obtain enhance nutritional content and fermentability of maize. Protein and fiber content in maize did not show significant changes due to germination, on the other hand, an increase in ash content and a decrease in lipids were observed. In general, at 4 days of germination were obtain best balance between free amino nitrogen, reducing sugars and α -amylases. Finally, in third stage, fermentation time and initial pH were optimized to maximize protein, probiotics and short chain fatty acids (SCFA) content using response surface methodology. It was found that the optimal conditions for protein, probiotics and SCFA were 56.2 h pH 7.0, 47.2 h pH 4.5, and 72.0 h pH 4.6 respectively, also, optimal conditions for different combinations of factors were calculated and combination of protein and probiotics was chosen (46.9h, pH 7.0) due to its high compound desirability (0.903). Through maize germination and fermentation, it was possible to increase the protein content in by 30.5% (db) and to obtain a safe drink with probiotic bacteria content of 8.9 Log, dose high enough to be considered probiotic, in addition, SCFA concentrations reached could have an effect on diabetes prevention and weight control.

1. INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha observado una creciente demanda de los consumidores por nuevos productos benéficos a la salud. La creciente incidencia de obesidad y enfermedades cardiovasculares, aunado a que cada vez hay mayor acceso a la información, ha hecho que la población tenga otras expectativas respecto a los alimentos. Ya no solo se busca nutrición, sino también beneficios para la salud. Algunas tendencias de las más importantes son mayor contenido de proteínas, reducción de azúcares y bacterias probióticas. En América Latina hubo un crecimiento del 17% en el consumo de alimentos con probióticos entre el 2013 y 2014 y se proyecta que en los próximos 10 años este comportamiento continúe al alza (EUROMONITOR 2014). La demanda de productos probióticos ha crecido a la par del entendimiento y la aceptación de los probióticos en la comunidad científica y por expertos de la salud. El proyecto Demostración de Funcionalidad Nutricional de los Alimentos Probióticos, entre otros muchos estudios ha demostrado el impacto positivo que tienen diversas bacterias probióticas. Entre sus efectos más notables, se ha demostrado que algunos probióticos pueden influir en la composición de la microbiota intestinal y modular el sistema inmune del hospedero con beneficios medibles en la salud (Reid 2016).

El yogurt es el ejemplo clásico de un alimento probiótico debido a que la elaboración consiste en un proceso de fermentación conocido desde la antigüedad. Sin embargo, están emergiendo procesos o formulaciones que permiten contener probióticos en una variedad mayor de productos. Se están investigando cada vez más matrices diferentes, entre las que destacan jugos de frutas y leguminosas donde sobresalen la soya y cereales (Vijaya et al. 2015). Estos últimos son medios prometedores para la elaboración de alimentos probióticos debido a su impacto nutrimental, económico y cultural en diversas regiones, sobre todo en países en desarrollo. Sin embargo, la calidad nutrimental y sensorial de los alimentos a base de cereales generalmente es pobre comparada con la de los alimentos lácteos, debido al bajo contenido de proteína, la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales y la presencia de compuestos antinutrimientales (Young y Pellett 1994).

La fermentación y la germinación se pueden emplear como estrategias para mejorar la calidad nutrimental de los cereales. Se ha reportado en ambos procesos una mejoría en el

perfil de aminoácidos ya sea por síntesis o por mejora de su disponibilidad (Klose y Arendt 2012; Nanson y Field 1984; Kazanas y Fields 1981; Ahmed et al 1979). Se ha observado que el proceso de germinación de cereales aumenta su contenido de proteínas y enzimas (Nelson 2013), por lo que es una buena estrategia para mejorar el perfil nutrimental de un alimento, además de permitir la presencia de metabolitos que faciliten el crecimiento de bacterias probióticas.

La mayor parte de los alimentos fermentados a base de cereales son bebidas tradicionales de diferentes países. En México el cereal tradicional por excelencia es el maíz y un par de las bebidas tradicionales fermentadas que existen a base del mismo son el pozol y el tesgüino. El pozol consiste en masa de nixtamal envuelto en hojas de plátano y espontáneamente fermentado, para luego ser suspendido en agua y emplearse como bebida refrescante. Por su parte, el tesgüino es una bebida tipo cerveza elaborada de maíz germinado, el cual es fermentado en recipientes que nunca son lavados, donde se encuentran los microorganismos iniciadores. La microbiología de ambas bebidas ha sido estudiada en diferente medida, sobre el pozol existe mayor cantidad de información. En el pozol se han identificado los microorganismos involucrados en la fermentación y se han aislado bacterias con potencial probiótico (Nuraida et al. 1995; Wachter et al. 1995; Ampe et al. 1999; Wachter et al. 2000). En el tesgüino se ha identificado la presencia de especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, aunque también predominan levaduras (Lappe y Ulloa 1989). Aún no está completamente reportada la microbiota bacteriana de estas fermentaciones, se cuenta con mayor información de las levaduras involucradas en el proceso ya que son los principales causantes de la fermentación. Algo a considerar es que se ha encontrado que las fermentaciones espontaneas conducen a productos de poca calidad microbiológica, con presencia de coliformes, sin embargo, hay información limitada sobre fermentación controlada de maíz germinado, sobre todo aquella dirigida a la obtención de una cuenta alta de bacterias probióticas en una bebida no alcohólica.

El objetivo del presente proyecto es desarrollar una bebida probiótica altamente nutritiva de maíz germinado, a partir de un proceso de fermentación controlado y estandarizado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Maíz

El maíz (*Zea mays* L.) se encuentra en la primera posición de los cereales más producidos a nivel mundial, seguido del arroz y el trigo (Figura 1) (FAOSTAT, 2018). Este cereal es un alimento básico y contribuye al 20% de las calorías derivadas de alimentos de la dieta mundial, incluso, en países en desarrollo llega a contribuir en un porcentaje mucho más importante a la ingesta calórica de la población (Vikal y Chawla 2014). La composición del grano de maíz se muestra en la Tabla 1.

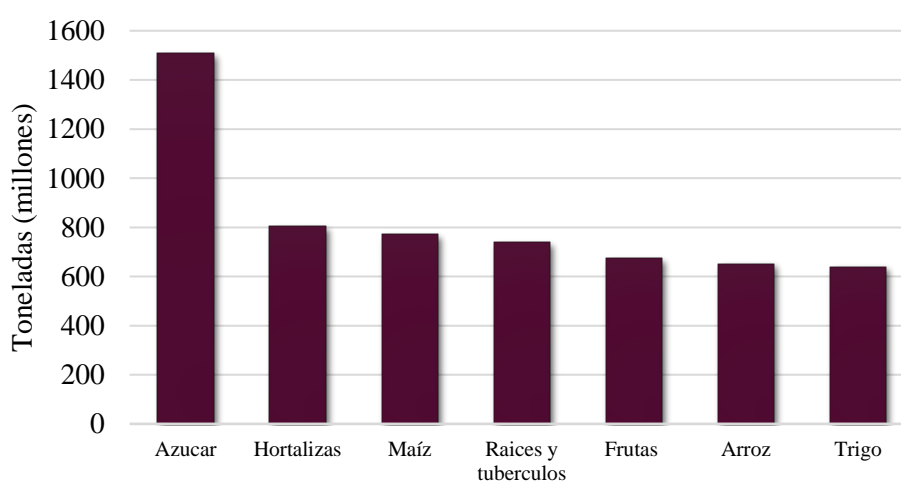


Figura 1. Alimentos más producidos en el mundo, promedio 1994 – 2019 (FAOSTAT, 2018).

En México el maíz es el cultivo más representativo debido a su importancia cultural y económica. Es poco común encontrar en otras especies la gran variabilidad genética que existe entre las diversas líneas y razas del maíz. México es considerado el lugar de la diversificación del maíz donde se han clasificado 59 razas basadas en su morfología y características bioquímicas, genéticas y moleculares (Urias 2010). El maíz es la base de innumerable cantidad de platillos y bebidas típicos, aunque su consumo se realiza también en forma de otros productos procesados. Se puede elaborar con técnicas de molienda en seco una gran variedad de productos intermedios, por ejemplo, sémola de partículas de diferentes tamaños, harina y almidón (Sakharam 2004). El consumo per cápita en el país es de 194.4 kg de maíz blanco y representa el 20.9% del gasto total en alimentos, bebidas y tabaco que realizan los mexicanos (SAGARPA 2017). A nivel mundial México ocupa el 4º lugar en producción de maíz. La producción nacional se

divide en maíz blanco y amarillo, donde el 86.9% es maíz blanco y se emplea principalmente para consumo humano.

Tabla 1. Composición bromatológica del grano de maíz por 100 g.

Humedad	7 - 23
Almidón	61 - 78
Proteína	6 - 12
Lípidos	3.1 - 5.7
Cenizas	1.1 - 3.9
Fibra	8.3 - 11.9
Azúcares	1.0 - 3.0

Tomado de (Arendt y Zannini 2013)

2.2. Germinación y malteado

La germinación es un proceso fisiológico y bioquímico en que inicia con la absorción de agua por la semilla seca y termina con la elongación del eje embrionario. En la Figura 2 se esquematiza el proceso de germinación, que consiste en tres fases: a) en la primera fase se lleva a cabo la imbibición, que es la absorción del agua necesaria para la rehidratación de proteínas y organelos celulares, y para que se lleven a cabo reacciones de hidrólisis; b) esta fase consiste en la activación del metabolismo, ocurriendo la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, el incremento en la actividad enzimática y la degradación de las reservas; c) en la tercera fase emerge la radícula y con esto concluye el proceso (Herrera 2006).

El malteado es una forma de germinación limitada en el que los granos de cereales, o incluso leguminosas, son sumergidos en agua y germinados bajo condiciones controladas. Las etapas de dicho proceso son: germinación, secado y tostado, y el producto resultante es denominado malta (González 2017). Esta práctica es ampliamente empleada por la industria cervecera como un paso previo a la fermentación, debido a la transformación de los almidones en azúcares fermentables.

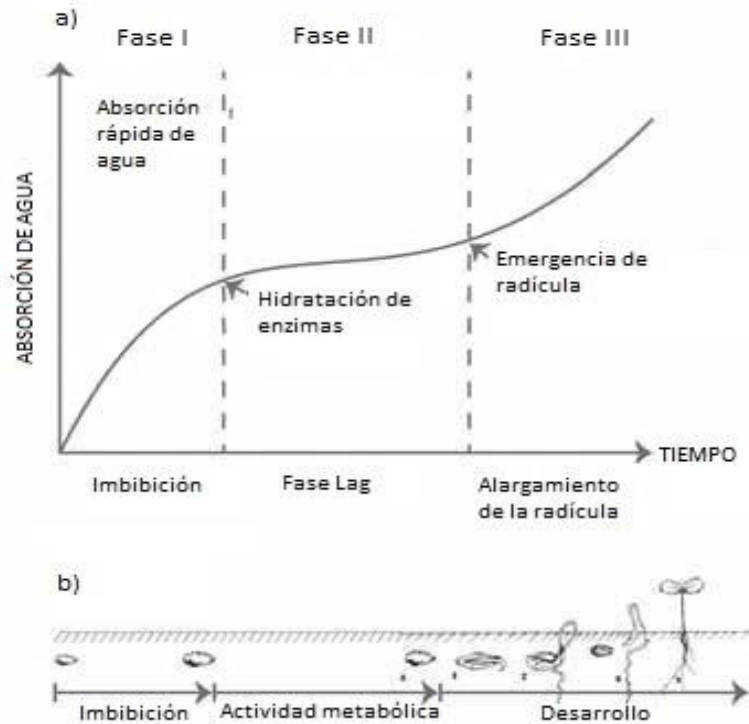


Figura 2. Fases de la germinación de los granos desde una perspectiva a) metabólica y b) física.

2.2.1. Cambios en la composición del grano

Durante la germinación de los granos se llevan a cabo múltiples procesos fisiológicos para apoyar el crecimiento de la planta, estos cambios alteran la composición nutricional y las características fisicoquímicas. En la Tabla 2 se muestran algunos cambios que suceden en los granos debido a la germinación y malteado.

Tabla 2. Efectos de la germinación de granos en sus compuestos nutrimentales y fitoquímicos.

Nutriente/	Tratamiento	Resultado	Tipo de grano
Almidón	Germinación	Degradado/ disminución	Trigo
Azúcares	Germinación	Aumento, varía con el tejido y el Aumento	Trigo Arroz
	Malteado	Aumento en muchos tipos de malta, pero disminuye con el aumento de la intensidad de calentamiento.	Cebada
Carbohidratos	Germinación	Sin cambio	Arroz
Proteína	Germinación	Aumento	Cebada, alforfón,
		Aumento	Arroz
		Disminución	Arroz
		Sin cambio	Trigo y cebada
Aminoácidos	Germinación	Disminución (63 proteínas)	Trigo

		Incremento en aminoácidos totales	trigo
		Incremento	Cebada
		Sin cambio	Arroz
Grasa	Malteado	Aumento y disminución	Cebada y trigo
	Germinación	Aumento	Cebada, avena y
		Disminución	Cebada
		Disminución	Arroz, alforfón, y
		Disminución	Trigo
Fibra dietaria	Germinación	Sin cambio	Arroz
		Aumento	Centeno
		Disminución a 6 h, incremento a 48 h	Trigo
Polifenoles	Malteado	Disminución	Arroz
	Germinación	Sin cambio	Centeno y avena
		Incremento	Amaranto,
		Disminución	Alforfón
Actividad antioxidante	Malteado	Sin cambio	Arroz
		Incrementa en algunas maltas y disminuye con la intensidad de calentamiento.	Cebada
	Germinación	Aumento	Amaranto, arroz,
		Disminución	Arroz
	Malteado	Incrementa para varios tipos de malta e incrementa con la intensidad de calentamiento.	Cebada

(Fragmento traducido de Nelson 2013)

La germinación y el malteado además de generar productos para fermentación, también son una vía para obtener alimentos con mayor contenido nutrimental y enriquecidos en compuestos benéficos para la salud (Hübner y Arendt 2013). Se ha observado que con la germinación aumenta el contenido de proteína y aminoácidos, incluyendo aminoácidos limitantes como lisina y triptófano (Klose y Arendt 2012), así como de fibra (Hung et al. 2011; Hübner et al. 2010) y compuestos antioxidantes en diferentes cereales (Zhang et al. 2007; Bhauso y Khan 2011; Jan et al. 2017).

En maíz se ha demostrado que la germinación del grano tiene múltiples beneficios nutrimentales y funcionales. Fageer y colaboradores (2004) determinaron que tras la germinación aumenta el contenido de lisina y la digestibilidad *in vitro* de la proteína, además de que se reduce el contenido de fitato, un compuesto antinutricional, hasta en un 71%. Se ha observado también que el contenido de compuestos fenólicos

aumenta durante la germinación, lo cual correlaciona con el aumento en la capacidad antioxidante (Xiang et al. 2017). Además, se ha encontrado evidencia de que durante la germinación se acumulan compuestos antifúngicos en el maíz, sobre todo en variedades susceptibles (Guo et al. 1997).

2.3. Fermentación

La fermentación es de los métodos de conservación de alimentos más antiguos que existen y el proceso biotecnológico más antiguo, los primeros alimentos fermentados fueron cervezas y pan leudado que datan de los años 3000-4000 a. C. Aunque la fermentación se trata de un proceso anaerobio llevado a cabo por microorganismos, actualmente el concepto se ha extendido a procesos aerobios, e incluso a procesos llevados a cabo con enzimas aisladas. De este modo, la fermentación se puede definir como un proceso por el cual compuestos orgánicos complejos son convertidos a compuestos simples con la producción de energía química en forma de adenosin trifosfato (ATP) (Mehta et al. 2012). Según el producto final formado, las fermentaciones se pueden clasificar de la siguiente manera:

- ❖ Fermentación alcohólica. Las enzimas producidas por levaduras degradan los carbohidratos en etanol y dióxido de carbono, siguiendo la reacción de enseguida:



- ❖ Fermentación láctica. Se produce ácido láctico a partir de los carbohidratos, como describe la siguiente reacción:



- ❖ Fermentación heteroláctica. Las moléculas de glucosa son convertidas en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono, de acuerdo con la siguiente reacción:



Steinkraus (1997) clasificó las fermentaciones del modo que se describe a continuación, el encontró esta clasificación útil para predecir los microorganismos que pueden estar involucrados y los cambios químicos, físicos y nutrimentales que pueden ocurrir en nuevas fermentaciones.

- a. Fermentaciones que producen proteína vegetal texturizada como sustituto de carnes en mezclas de leguminosas y cereales. Un par de ejemplos son el tempe y el ontjom de Indonesia.

- b. Salsas y pastas fermentadas altas en sal o con sabor salado, y sabor a cárnico/aminoácido/péptido. Son alimentos principalmente orientales, por ejemplo, la salsa de soya China, el miso Japones o las salsas de pescado vietnamitas.
- c. Fermentaciones ácido lácticas. Por ejemplo, los pepinillos, el sauerkraut, el kimchi coreano, los vegetales en escabeche de Egipto, India, Malasia y China. Estas fermentaciones incluyen además las derivadas de la leche, como el yogurt, los quesos y el kéfir; las derivadas de mezclas de yogurt y trigo; panes leudados y fermentados; salchichas fermentadas; y fermentaciones ácido lácticas de cereales y tubérculos.
- d. Fermentaciones alcohólicas. Algunos ejemplos de este tipo de fermentaciones son el vino, las cervezas de diferentes cereales, el pulque, vinos de miel, azúcar de caña y palma, el kaffir, el sake, el pito de Nigeria, la talla de Etiopia, la busaa de Kenia, el tape de Indonesia, entre otros.
- e. Fermentaciones acéticas. Algunos ejemplos son los vinagres de vino y cidra de manzana, el vinagre de palma de África, el vinagre de agua de coco en Filipinas y la kombucha.
- f. Fermentaciones alcalinas. Como ejemplos encontramos la dawadawa de Nigeria, el iru africano, la kenima de India, el natto de Japón y el thua-nao de Tailandia.
- g. Panes leudados. En esta categoría se encuentran los panes de levaduras y masas agrias.

2.3.1. Importancia tecnológica y nutricional

El proceso de fermentación confiere cambios de textura, sabor, color y características nutrimentales a los alimentos. Los principales roles atribuidos a la fermentación son los siguientes: a) conservación de los alimentos a través de la formación de metabolitos inhibitorios como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido propionico), etanol, bacteriocinas, diacetil, dióxido de carbono, etc., a veces en combinación con la disminución de la actividad de agua por secado o uso de sal; b) mejoramiento de la seguridad de los alimentos mediante la inhibición de patógenos o removiendo compuestos tóxicos; c) mejoramiento de la calidad sensorial del alimento; d) y mejorando el valor nutricional (Ray y Didier 2014).

Desde el punto de vista nutricional, en cereales se han determinado diferentes beneficios derivados de la fermentación. Algunos cereales y leguminosas presentan compuestos antinutricionales, es decir, que afectan la absorción de nutrientes, algunos ejemplos de estos compuestos son: taninos, ácido fítico y polifenoles. El proceso de fermentación reduce significativamente el contenido de dichos compuestos antinutricionales en cereales y leguminosas (Hamed y Hussein 2017; Sindhu y Khetarpaul 2001). La reducción de ácido fítico puede deberse a la actividad de fitasas que poseen algunas bacterias, por su parte la reducción de polifenoles puede ser consecuencia de la actividad de polifenoloxidasas presentes en el grano o la microbiota. La reducción de fitatos puede aumentar varias veces el contenido de hierro, zinc y calcio solubles, también aumenta la disponibilidad de vitaminas de grupo B (Kohajdová y Karovičová 2007). Por otra parte, la fermentación de cereales con bacterias ácido lácticas ha reportado aumentar la cantidad de aminoácidos libres por proteólisis o por síntesis metabólica. En maíz, arroz, trigo, sorgo entre otros cereales, se ha encontrado que aumenta el contenido de lisina, metionina y triptófano, aumentando así su valor nutricional (Nanson y Field 1984; Kazanas y Fields 1981; Ahmed et al 1979). La fermentación del maíz puede aumentar levemente su contenido de proteína, y mejora su digestibilidad (Yousif y Tinay 2000). La mejora en la digestibilidad de las proteínas causada por la fermentación está asociada con la actividad proteolítica de la microbiota fermentadora y la disminución de los compuestos antinutricionales.

La fermentación se puede emplear como una estrategia para obtener alimentos nutraceuticos. Durante la fermentación de alimentos se pueden formar o puede mejorar la disponibilidad de diferentes compuestos bioactivos como péptidos, exopolisacáridos, compuestos fenólicos, neurotransmisores, y vitaminas (Marco et al. 2017). Un ejemplo del empleo de esta estrategia es que se ha optimizado la fermentación de la leche de soya para obtener péptidos con actividad antihipertensiva (Vallabha y Tiku 2013). En algunos cereales se incrementa la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos tras la fermentación, donde el grado del incremento varía con el microorganismo iniciador (Đorđević et al. 2010; Pyo et al. 2005). El incremento en estos compuestos bioactivos se atribuye a que durante la fermentación hay rompimiento de las paredes celulares, lo que lleva a la liberación y síntesis de estos compuestos. Por su parte, el aumento en la actividad antioxidante se puede atribuir a los compuestos fenólicos (Wang et al. 2014). Por otra parte, los

alimentos fermentados pueden ser vehículos de diferentes bacterias que tienen un impacto positivo en la salud de los consumidores, este tema se abordará a detalle más adelante.

2.3.2. Alimentos fermentados a base de maíz

En la Tabla 3 se encuentran descritos diversos alimentos fermentados a base de maíz. Se aprecia que en su mayoría se trata de bebidas y que las principales regiones que emplean este cereal en fermentaciones son América Latina y África. En la Tabla 4 se muestran los microorganismos reportados en la fermentación espontánea de algunos de estos alimentos tradicionales. Gran parte de estos alimentos fermentados tradicionales fueron desarrollados en México y Perú por poblaciones indígenas hace cientos de años, estos alimentos se elaboran regionalmente y son utilizados con fines domésticos, medicinales y en ceremonias religiosas (Verdugo et al. 2008). Las bebidas fermentadas de maíz más importantes desde el punto de vista tradicional, nutricional y comercial son el pozol y el tsegüino. El pozol es una bebida ligeramente ácida consumida principalmente por grupos étnicos como Chontales, Mayas, Lacandones, Tzeltales, Tzotziles, Tojolabales, Chamulas, Mames, Zoques y Zapotecos en el sureste de México (Haard et al. 1999). Su proceso de elaboración consiste en la nixtamalización del maíz, lavado y molienda para obtener masa, esta se forma en bolas y se envuelve en hojas de plátano, para posteriormente dejarse fermentar por 1-15 días.

Tabla 3. Alimentos tradicionales fermentados a base de maíz. Modificada de: Steinkraus 1983; Kohajdova y Karovičová 2007; Haard et al 1999.

Nombre del producto	Contenido de alcohol	Descripción	Área de producción
Pito	Si	Bebida a base de maíz y/o sorgo, el grano es malteado, molido y hervido, después se filtra, deja	Nigeria, Ghana
Kaffir	Si	Bebida tipo cerveza a base de maíz efervescente y con sabor tipo yogurt	Sur África
Busaa	Si	Bebida tipo cerveza espesa ácida a base de maíz mijo y/o sorgo	East África
Cerveza de	Si	Bebida tipo cerveza a base de maíz	Uganda
Cerveza de	Si	Bebida tipo cerveza espesa ácida a base de maíz al que se le agrega malta de cereales.	Zambia
Bouza	Si	Bebida de trigo o maíz, parte del grano se muele y amasa con agua y se forman hogazas, otra parte se	Egipto
Chicha	Si	Bebida tipo cerveza a base de maíz de variedades de color, similar a la sidra.	Sur América
Munkoyo	Puede	Bebida usualmente no alcohólica, pero si se fermenta un día extra hay producción de alcohol.	Zambia
Uji	No	Alimento tipo atole a base de maíz sorgo o tapioca, cocido y fermentado.	East África
Ogi	No	Atole a base de maíz sorgo o mijo fermentado. Los granos se remojan, muelen y tamizan, el filtrado se	Nigeria, Benín
Bogobe	No	Atole suave de sorgo o maíz fermentado.	Botswana,
Mawe	No	Masa agria preparada de maíz descascarillado fermentado por 3 días.	Dahomey
Mahewu	No	Se prepara agregando harina de maíz en agua hirviendo y posteriormente se fermenta por 1 día.	Sur África
Banku	No	preparado a partir de maíz y/o tapioca, se remoja el material, se muele y fermenta por 3 días, la masa	Gahana
Kenkey	No	Masa de maíz es separada en dos fracciones, una se cose para preparar atole, la otra se mezcla con	Gahana
Abati	Si	Bebida a base de maíz	Paraguay,
Acupe	No	Bebida basada en maíz germinado, fermentado y endulzado	Venezuela
Agua-agria	No	Bebida basada en maíz molido y agua	México
Atole agrio	No	Atole basado en masa de maíz negro fermentado 4-5 días.	México
Cachiri	No	Bebida fermentada basada en maíz, manihot o frutas producida en vasijas de barro.	Brasil
Champuz	No	Bebida fermentada basada en maíz o arroz.	México
Chica	Si	Bebida basada en piña, centeno y masa de maíz negro, fermentada por 4 días, después se agrega azúcar	Colombia, Perú
Charagua	Si	Bebida basada en pulque, chile y hojas de maíz tostadas, calentada y fermentada.	México
Fubá	No	Granos de maíz germinados fermentados en agua.	Brasil
Jamin-bang	No	Pan a base de maíz fermentado 3-6 días.	Brasil
Napú	No	Bebida basada en maíz germinado, molido y fermentado.	Perú
Ostoche	Si	Bebida basada en jugo de maíz y pulque o azúcar morena.	México
Pozol	No	Bebida ácida basada en maíz. Bolas de masa son envueltas en hojas de plátano y fermentadas.	México
Quebranta	Si	Bebida basada en jugo de maíz tostado y frutas purú.	México
Sendechó	Si	Bebida tipo cerveza a base de maíz y chile rojo, la masa es suspendida en agua, hervida, enfriada e	México
Sora	Si	Bebida a base de maíz germinado, molido, cocido y fermentado.	Perú
Tepache	Si	Bebida basada en granos de maíz, azúcar morena y agua	México

Tesgüino	Si	Bebida tipo cerveza a base de maíz germinado, molido, cocido y fermentado con plantas como fuente	México
Tocos	No	Postre a base de maíz fermentado por 2-3 meses y cocido.	Perú
Vino de	Si	Bebida a base de cerveza de maíz y corteza de zarzaparrilla.	México

Tabla 4. Microorganismos aislados de alimentos tradicionales de maíz fermentado.

Matriz	Microorganismo	Fuente
Atole	Bacterias ácido lácticas	Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2010
BogobeKoko y kenkey	<i>Lactobacillus spp.</i> y levaduras	FAO 1999
Bouza	Desconocido	FAO 1999
Boza	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. coprophilus</i> , <i>Leuconostoc reffinolactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> ,	Blandino et al. 2003; Gotcheva et al. 2000
Boza	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranium</i>	Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2011
Busaa (maize beer)	Levaduras y <i>Lactobacillus spp.</i>	FAO 1999
Cerbeza de Malawa	<i>Candida krusei</i>	FAO 1999
Cerbeza de Zambia	Levaduras	FAO 1999
Champus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> , <i>Torulospora delbrueckii</i> , <i>Galactomyces</i>	Chaves-Lopez et al 2014
Chicha	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> . levaduras principalmente, LAB fermentadoras de maltosa	Chaves-Lopez et al 2014
Chicha	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus spp</i>	FAO 1999
Ilambazi lokubilisa	Bacterias ácido lácticas	Farnworth 2005
Kaffir beer	<i>Lactobacillus spp.</i> y levaduras	FAO 1999
Kenkey	Hongos (<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i>), <i>Streptococcaceae</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lb. mesenteroides</i> , <i>Lb. fermentum</i>	FAO 1999
Kenkey	<i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , <i>yeast</i>	Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2011
Mahewu	<i>Candida Krusei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAO 1999
Mahewu	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Blandino et al. 2003;

Mahewu	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. brevis</i>	McMaster et al. 2005
Masa agria	Especies de <i>Lactobacillus</i> , en particular <i>Lb. plantarum</i> and <i>Lb. fermentum</i>	Chaves-Lopez et al 2014
Masa agria	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CPQBA 087–11 DRM)	Chaves-Lopez et al 2014
Mawe	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. cellobiosis</i> , <i>Lb. brevis</i> , levaduras	FAO 1999
Mawe	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hounhouigan et al. 1999
Munkoyo	Bacterias ácido lácticas y levaduras desconocidas	FAO 1999
Ogi	<i>Lactobacillus</i> spp., levaduras	FAO 1999
Ogi	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2011
Pito	Hongos, levaduras y <i>Lactobacillus</i> sp.	FAO 1999
Pozol	<i>Streptococcus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Weisella</i> , <i>Lactococcus</i>	Ampe et al. 1999
Pozol	3 fases: 1) <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , 2) LAB, <i>Leuconostoc</i> species, <i>Lb. fermentum</i> , 3) LAB, <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Bifidobacterium</i>	Farnworth 2005
Pozol	<i>Streptococcus macedonicus</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus sulfureus</i>	Díaz Ruiz et al 2003
Pozol	<i>Streptococcus bovis</i>	Díaz Ruiz et al 2003
Pozol	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , levaduras y hongos	Nuraidia et al. 1995
Pozol	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , levaduras y hongos	Wacher 2000
Pozol	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Agrabacterium azotophilum</i>	Wacher 1995
Seketeh	Desconocido	FAO 1999
Tesgüino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	FAO 1999
Tesgüino	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Straptococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Hansenula anomala</i>	Lappe y Ulloa 1989
Togwa	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lb. Plantarum</i> A6	Vasudha y Mishra 2015
Uji	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. bulgaricus</i>	FAO 1999
Uji	Bacterias ácido lácticas	Onyango et al. 2003

La bebida se elabora suspendiendo en agua la masa fermentada, se le puede agregar además leche, azúcar o cocoa. Existen dos tipos básicos de pozol: el tradicional, preparado por indígenas, y el mestizo, caracterizado un paso adicional de cocción del maíz para mejorar la solubilidad en agua (Guyot et al. 2003). El tesgüino por su parte es una bebida tipo cerveza consumida por diversos grupos étnicos principalmente en el noreste y este de México, como Yaqui, Pima, Guajiros, Tepehuan, Tarahumara y Hicholes. Para varios de estos grupos, el tesgüino representa la bebida más popular para eventos sociales, deportivos y ceremonias religiosas. Desde el punto de vista antropológico esta bebida es relevante debido a su importante rol en la vida de dichas culturas (Kennedy 1963). El proceso de elaboración de esta bebida consiste en germinar granos de maíz en la oscuridad, para después molerlos y hervirlos en agua, posteriormente se filtra y se vacía en una olla tesgüinera donde se añaden algunas hierbas como catalizadores y se deja fermentar durante 1-10 días, cabe mencionar que las ollas nunca son lavadas así que contienen restos de fermentaciones anteriores (Lappe y Ulloa 1989).

2.4. Probióticos

En años recientes ha aumentado el interés por los alimentos con efectos saludables, tanto de la comunidad científica como por los consumidores en general. Algunos motivos del consumidor son: la conciencia del deterioro en la salud derivado de estilos de vida ocupados y poca actividad física, el aumento de la información expuesta por las autoridades de salud y por los medios sobre el impacto de la alimentación sobre la salud. Esto ha promovido que se comiencen a desarrollar alimentos no solo destinados a satisfacer el hambre y nutrir, sino que además ayuden a prevenir enfermedades relacionadas con la dieta y mejoren el bienestar físico de los consumidores (Siró et al. 2008). A este tipo de alimentos se les denomina alimentos funcionales, dentro de los cuales está la categoría de los probióticos.

La palabra probiótico se deriva del griego y significa “a favor de la vida”, esta palabra fue introducida por Ferdinand Vergin, un investigador que estaba estudiando el efecto de los antibióticos en la microbiota del intestino, el llamó “probiotika” a lo favorable para la microbiota (Pandey et al. 2015). En 2001, la FDA y WHO definieron en conjunto el término probiótico como “microorganismos vivos que cuando son administrados en

cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero”. En lo que respecta a los probióticos, el 76% de los consumidores están al tanto de lo que son y de estos el 79% preferiría obtener sus probióticos de alimentos y bebidas (NPI, 2007), lo cual significa que los consumidores están más informados de los alimentos que ofrecen beneficios a la salud, y por otro la aceptación de los alimentos probióticos. Dicha aceptación abre una posibilidad para que los productos de características probióticas, lleguen a tener un impacto positivo en la salud general de la población.

2.4.1. Efectos de los probióticos a la salud

El proyecto “Demostración de funcionalidad nutricional de los alimentos probióticos” de la Autoridad Europea de Seguridad alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés), entre otros muchos estudios, han demostrado el impacto positivo en la salud que tienen diversas bacterias probióticas. Efectos muy diversos han sido reportados, sin embargo, las propiedades, la funcionalidad y los beneficios que se pueden obtener por la ingesta de un probiótico son atribuibles a una cepa particular y no pueden extrapolarse a otras cepas, incluso dentro de la misma especie (Pineiro y Stantont 2007). Entre los efectos más notables, se ha demostrado que algunas especies de bacterias probióticas pueden influir en la composición de la microbiota intestinal y modular el sistema inmune del hospedero. Se ha demostrado que *Lactobacillus reuteri* cuando forma biofilms secreta factores que ayudan a la inmunomodulación y a la inhibición de patógenos (Jones y Versalovic 2009). En un estudio con *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis BI-04 se determinó que esta bacteria ayuda a reducir el riesgo de enfermedad del tracto respiratorio superior en adultos (West et al. 2013). En adultos mayores, suplementar su dieta con yogurt con probióticos mejora la respuesta inmune al modular la activación de marcadores en fagocitos en sangre y normalizar la respuesta a endotoxinas, además puede ayudar a reducir la inflamación crónica (Schiffrin et al. 2008). En un estudio con niños de 1-5 años se observó que *Saccharomyces boulardii* disminuye la tasa de incidencia de diarrea asociada con el uso de los antibióticos sulbactam-ampicilina y azitromicina. (Erdeve et al. 2004).

2.4.1.1. Producción de ácidos grasos de cadena corta

La microbiota del colon, incluyendo potencialmente a las bacterias probióticas, tienen la capacidad de fermentar polisacáridos (componentes principales de la fibra dietética) para

formar ácidos grasos de cadena corta (Topping y Clifton 2001). Los principales compuestos formados son ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, que conforman el 83%, el resto son los ácidos isovalérico, isobutírico, valérico, láctico, fórmico y succínico (Rombeau et al. 1990). El ácido acético y el propiónico pasan a la circulación periférica, por su parte el ácido butírico es predominantemente metabolizado en el colon siendo es el sustrato más utilizado por los colonocitos, y es importante mencionar que se ha encontrado que promueve la salud de estas células (Astbury y Corfe 2012). Se ha reportado que los ácidos grasos de cadena corta tienen diversos efectos positivos en la salud entre ellos control del peso y de la sensibilidad a la insulina (Canfora et al. 2015), propiedades antiinflamatorias (Tedelind et al. 2007), reducción del riesgo de desarrollar enfermedades gastrointestinales, cáncer de colon y enfermedades cardiovasculares (Hijova y Chmelarova 2007).

2.4.2. Alimentos con probióticos

Se clasifican los alimentos probióticos en dos categorías: lácteos y no lácteos, en la Figura 3 se indica la clasificación completa. Los probióticos comercialmente se encuentran de forma convencional en lácteos fermentados, que son los vehículos predominantes para el consumo de probióticos, sobresaliendo en esta categoría el yogurt, que representa el 78% de las ventas de productos probióticos (Granato et al. 2010 a). Sin embargo, los productos lácteos presentan algunas desventajas: tienen un elevado contenido de colesterol, contienen alérgenos y lactosa derivados de la leche, y son alimentos de origen animal, lo que limita su consumo por veganos o vegetarianos, personas intolerantes a la lactosa o alérgicos a las proteínas de la leche, pacientes con enfermedades cardiovasculares u obesidad (Granato et al. 2010 b). Debido a esto, los alimentos con probióticos no lácteos están aumentando su presencia, donde sobresalen los alimentos fermentados, los derivados de frutas y vegetales, a base de cereales y a base de soya (Vijaya et al. 2015). La mayor parte de los alimentos fermentados tradicionales pertenecen al grupo de los derivados de los cereales, que es el grupo menos estudiado en cuanto al desarrollo de alimentos probióticos innovadores en la industria actual (Min 2018).

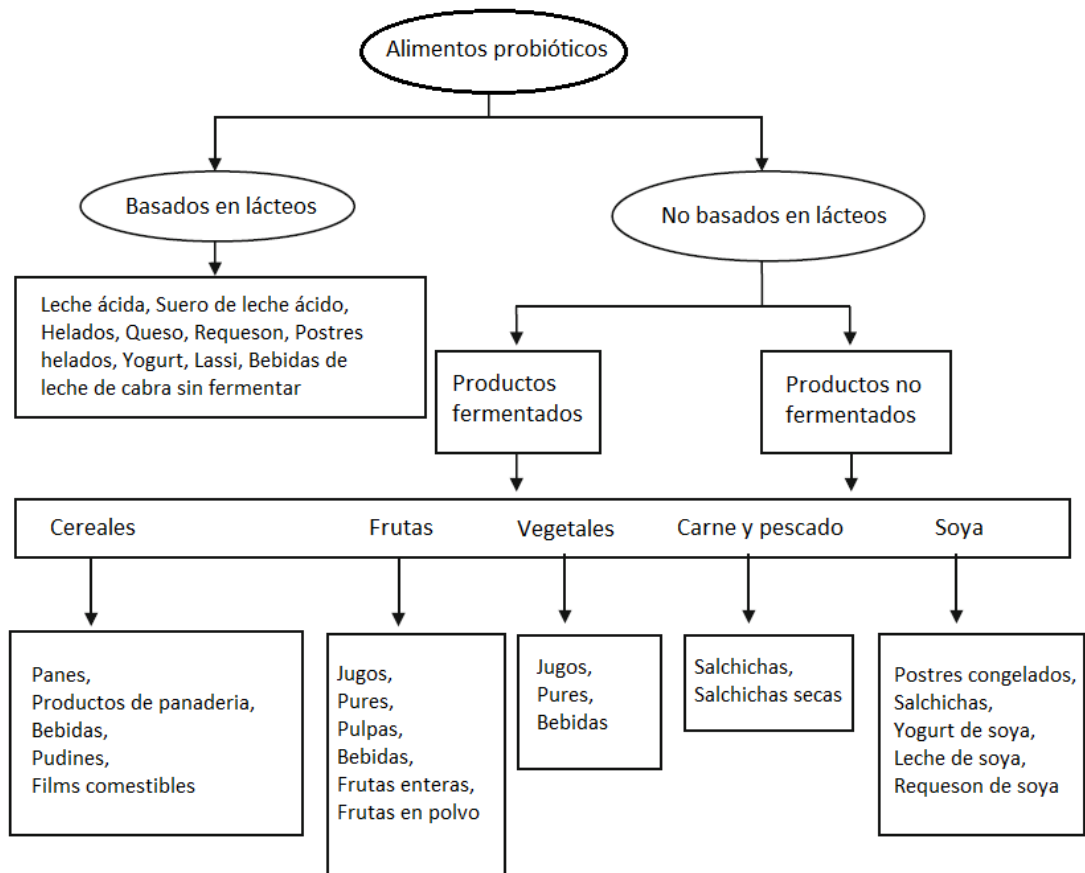


Figura 3. Diagrama de la clasificación de los alimentos probióticos (traducido de Vijaya et al. 2015).

2.4.3. Evaluación de microorganismos probióticos

Para el diseño de alimentos con probióticos hay una serie de consideraciones a tener en cuenta para obtener un alimento seguro y eficaz. Seleccionar el microorganismo es el paso más importante para el desarrollo de un alimento con probióticos, en la Figura 4 se observan los criterios de selección. Por definición, para que un microorganismo dado se pueda considerar probiótico debe causar un efecto positivo y debido a que los efectos de un probiótico están asociados a cepas, es necesario tener identificado el microorganismo específico (FAO 2002).

En lo que respecta a consideraciones de bioseguridad, es necesario contar con evidencia que asegure que el microorganismo no cause infecciones o tenga efectos secundarios. Debido a la posibilidad de movilización de elementos genéticos, la resistencia a antibióticos no es una característica aceptable para un microorganismo probiótico, ya que

se especula que los probióticos pueden actuar como reservorios de genes de resistencia (Mathur y Singh 2005). En este sentido aun es necesario estandarizar los ensayos requeridos para determinar la potencial transmisión de elementos genéticos a otros microorganismos intestinales o de los alimentos (Pineiro y Stanton 2007).

Para que un microorganismo ejerza efectos fisiológicos, primero debe de ser capaz de sobrevivir al paso del estómago, con un ambiente altamente ácido, y posteriormente conservar su viabilidad en las condiciones alcalinas del intestino debidas a las sales biliares (Vinderola y Reinheimer 2003). Una vez que está en el intestino, el probiótico debe ser capaz de colonizar para no ser eliminado debido a los movimientos peristálticos. La capacidad de adhesión al epitelio del intestino en los microorganismos es mediada por adhesinas y receptores complementarios, y se ha observado que la autoagregación parece ser necesaria también (Kos et al. 2003).

Desde el punto de vista tecnológico, se presentan varios retos para obtener alimentos probióticos. Los microorganismos seleccionados deben ser capaces de crecer en la matriz alimenticia seleccionada en cantidades adecuadas para ejercer sus efectos (generalmente reconocida como 6 ciclos logarítmicos). Adicionalmente, los probióticos deben permanecer viables y conservar sus propiedades tras el procesado y durante el almacenamiento, sin embargo, algunas cepas son sensibles a diferentes condiciones de fermentación como al oxígeno y al pH (Hage et al. 2017). Por otra parte, algunas cepas pueden variar su funcionalidad en presencia de diferentes ingredientes en los alimentos y por la composición fisicoquímica (Corcoran et al. 2005; Sheehan et al. 2007), además, los alimentos pueden encapsular al probiótico durante su paso por el tracto digestivo, regular su capacidad de colonización y contener otros ingredientes bioactivos que pueden alterar su funcionalidad y eficacia (Ranadheera et al. 2010).



Figura 4. Factores a evaluar para la selección de probióticos con aplicación en alimentos.

(Adaptado de Tripathi y Giri 2014; Salminen et al. 1998).

2.4.4. Probióticos, prebióticos y simbióticos

Los prebióticos se pueden definir como “ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al hospedero mediante la estimulación del crecimiento o la actividad de una bacteria o un número limitado de ellas en el colon” (Gibson y Roberfroid 1995). Estos compuestos son principalmente carbohidratos no digeribles, es decir, fibra dietética. Sin embargo, no toda la fibra dietética se puede considerar prebiótica, para clasificar un ingrediente alimenticio de este modo debe cumplir los siguientes criterios: 1) resistir la acidez gástrica, la digestión por enzimas y la absorción gastrointestinal; 2) ser fermentada por la microbiota intestinal; y 3) estimular selectivamente el crecimiento o actividad de las bacterias que contribuyen a la salud y bienestar del hospedero (Roberfroid 2007). No todas las fibras pueden clasificarse como prebióticas, sin embargo, la mayoría de los prebióticos se pueden clasificar como fibras dietéticas. Estudios han proporcionado evidencia de que la inulina y la oligofruktosa (OF), la lactulosa y el almidón resistente (RS) cumplen con todos los aspectos de la definición, otros carbohidratos, incluidos fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), povidex, dextrina, goma de acacia, psyllium, también tienen efectos

prebióticos (Slavin 2013). Los arabinosilanos (AX) también son oligosacáridos que constituyen una fracción importante de los polisacáridos de la pared celular de los cereales, sin embargo, hay pocos informes sobre su función prebiótica. Estos compuestos consisten en una cadena principal xilano linear unido por enlaces β -(1 \rightarrow 4) a la cual unidades de α -L-arabinofuranosa se unen como residuos laterales a través de enlaces α -(1 \rightarrow 3) y/o α -(1 \rightarrow 2) (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Es relevante mencionare que estos compuestos conforman la mayor parte de la fracción soluble de la fibra del maíz.

El mecanismo por el cual se da el efecto benéfico de los prebióticos sobre las funciones inmunológicas sigue sin estar claro, sin embargo, se han propuesto varios modelos posibles (Markowiak y Śliżewska 2017):

- ❖ Los prebióticos pueden regular la acción de las enzimas lipogénicas hepáticas al influir en el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el ácido propiónico.
- ❖ La producción de ácidos grasos de cadena corta (especialmente de ácido butírico) como resultado de la fermentación se identificó como un modulador de la acetilación de histonas, aumentando así la disponibilidad de numerosos genes para los factores de transcripción.
- ❖ La modulación de la producción de mucina.
- ❖ Se demostró que fructooligosacaridos y varios otros prebióticos causan un aumento en el recuento de linfocitos y/o leucocitos en los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) y en la sangre periférica.
- ❖ Aumento de la secreción de IgA por los GALT puede estimular la función fagocítica de los macrófagos intrainflamatorios.

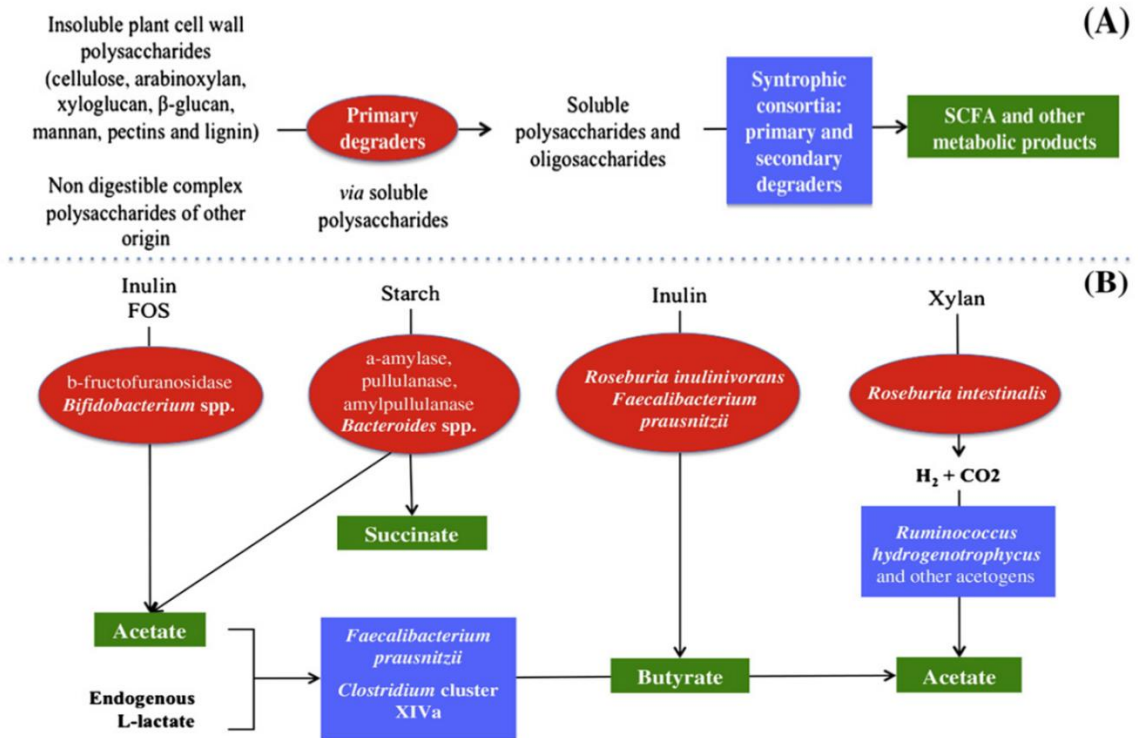


Figura 5. (A) Establecimiento de consorcios sintróficos en el ecosistema del colon humano. (B) Principales rutas metabólicas bacterianas de la fermentación de oligosacáridos y de alimentación metabólica cruzada. Tomado de Candela et al. 2010.

En la Figura 5 se aprecian los consorcios de bacterias que interactúan para metabolizar la fibra dietaria y las principales rutas de producción de ácidos grasos de cadena corta a partir de diferentes fibras. Los polisacáridos complejos insolubles se convierten en ácidos grasos de cadena corta y oligosacáridos solubles por las bacterias degradantes primarias, que se caracterizan por la presencia de enzimas específicas que no se comparten con otras bacterias comensales. Los productos finales de fermentación primaria alimentan diferentes mecanismos de alimentación cruzada por medio de los cuales las bacterias degradadoras secundarias originan una gran cantidad de ácidos grasos de cadena corta (Candela et al. 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de una bebida inocua de maíz germinado fermentado, con propiedades probióticas y nutrimentalmente superior con respecto a las bebidas tradicionales representa beneficios para el bienestar de la población mexicana de más bajos recursos, que tienen la cultura del consumo del maíz fermentado. Además, ciertas poblaciones que tienen restringido el consumo de lácteos como personas propensas a hipercolesterolemia, intolerantes a la lactosa, con alergia a las proteínas lácteas y veganos, podrán tener una opción de un alimento probiótico que promueva su salud intestinal y una nutrición más completa.

Se ha investigado la microbiota en fermentación espontánea del maíz y se han aislado e identificado microorganismos probióticos e inclusive se han fermentado de manera controlada el maíz cocido y nixtamalizado con dichos microorganismos. Sin embargo, no existen estudios especializados en la fermentación del maíz germinado con probióticos. Con el presente trabajo se obtendrá conocimiento sobre como los procesos de germinación y fermentación en conjunto afectan la calidad nutrimental del maíz. Por otra parte, es un hecho que el proceso de germinación del maíz cambia sustancialmente las características de la matriz, debido a que durante este proceso fisiológico se forman enzimas, se desdoblan almidones y aumenta ligeramente la proteína, esto puede afectar la dinámica de fermentación, la viabilidad y las características de los probióticos, sin embargo, tampoco existen reportes del efecto de la fermentación del maíz germinado en las características funcionales de dichos microorganismos, por lo cual el estudio de dicho efecto es uno de los objetivos de este trabajo.

4. HIPÓTESIS

La fermentación de maíz germinado permite la obtención de una bebida con un contenido de microorganismos probióticos en al menos 6 ciclos logarítmicos, sanitaria y con alto valor nutritivo.

5. OBJETIVO

Desarrollar un proceso de fermentación para obtener una bebida probiótica a base de maíz germinado y evaluar sus características nutricias, probióticas y sanitarias.

5.1. Objetivos particulares

- Seleccionar microorganismos evaluando sus características.
- Definir las condiciones de pretratamiento y el tiempo de germinación para obtener germinado de maíz nutritivo y fermentable.
- Optimizar un proceso de fermentación de maíz con los microorganismos seleccionados, para obtener una bebida con una cuenta de probióticos de al menos 6 logaritmos.
- Caracterizar nutrimental y fisicoquímicamente la bebida probiótica fermentada.

6. CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE MICROORGANISMOS COMO PROBIÓTICOS

6.1. Resumen

Se compararon las características probióticas de: resistencia a barreras biológicas (fluidos gástricos e intestinales), adhesión a epitelio intestinal y resistencia a antibióticos de 16 bacterias ácido-lácticas y posteriormente se evaluó su capacidad para fermentar fibras alimentarias y producir ácidos grasos de cadena corta. Se encontró que *Lactobacillus acidophilus* DSM 17742, *L. plantarum* V3, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. plantarum* LMG P-20353, *L. plantarum* 299v y *L. casei* LMG P-20352 sobrevivieron a las condiciones gástricas y del intestino *in vitro* y mostraron ser adherentes a las células CaCo2. *L. acidophilus* ATCC 4356 y *L. casei* LMG P-20352 mostraron resistencia a la mayoría de los antibióticos probados, los resultados sugieren que son mutantes resistentes. *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* DSM 17742 fueron las bacterias con mejores características probióticas entre las cepas evaluadas, también fueron capaces de crecer tanto en inulina como en fibra de maíz soluble y fueron capaces de producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

6.2. Introducción

En 2001, la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud definieron conjuntamente el término probiótico como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped”. Entre los efectos más notables, se ha demostrado que algunas especies de bacterias probióticas pueden influir en la composición de la microbiota intestinal y modular el sistema inmunitario del huésped (Reid 2016). Hoy en día, muchos cultivos puros bacterianos están disponibles para aplicaciones alimenticias y farmacéuticas, sin embargo, la declaración de probióticos, propiedades, funcionalidad y beneficios que se pueden obtener al ingerir, son atribuibles a cepas particulares y no se pueden extrapolar a otras cepas, incluso dentro de la misma especie (Pineiro y Stantont 2007).

Debido a los beneficios nutricionales asociados con la modulación de la microbiota, los alimentos son el principal vehículo para los pro- y pre-bióticos. Los ingredientes

alimentarios clasificados como prebióticos no deben hidrolizarse ni absorberse en el tracto gastro-intestinal superior, deben ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias del colon, deben alterar la composición de la microbiota en el colon a una más saludable y deben inducir efectos lumbinales o sistemáticos beneficiosos para la salud del huésped (Gibson y Roberfroid 1995). Los prebióticos son fibras dietéticas y los más tradicionales y bien estudiados son inulina, fructo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos (Rajendran et al. 2017).

El término sinbiótico se usa cuando un producto contiene probióticos y prebióticos, específicamente, este término se refiere a alimentos o bebidas en los que el compuesto prebiótico favorece selectivamente al compuesto probiótico (Schrezenmeir y de Vrese 2001). Una combinación apropiada de ambos componentes en un solo producto debe garantizar un efecto superior en comparación con la actividad del probiótico o prebiótico de manera individual. La combinación de bacterias de los géneros *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* con fructooligosacáridos o inulina en productos simbióticos parece ser la más popular (Markowiak y Slizewska 2017); Sin embargo, considerando la gran cantidad de combinaciones posibles, la aplicación de simbióticos para la modulación de la microbiota intestinal en humanos, entre otros beneficios para la salud, parece prometedora. Por ejemplo, los arabinosilanos son oligosacáridos que constituyen una fracción importante de los polisacáridos de la pared celular de los cereales (Izydorczyk y Biliaderis 1995). Muchos cereales contienen cantidades importantes de arabinosilanos, sin embargo, el maíz se destaca por tener un 21% en su fibra, todos ellos en la fracción soluble (Ayala-Soto et al. 2014). Las fibras de maíz son ingredientes comunes en los productos alimenticios, pero han sido menos estudiadas con respecto a su función prebiótica. El objetivo de este capítulo fue seleccionar bacterias en función de las características probióticas (resistencia a los fluidos gástricos e intestinales, adherencia al epitelio intestinal, susceptibilidad a los antibióticos), y probar su capacidad para fermentar inulina y fibra de maíz soluble.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de bacterias probadas y su proveedor se enumeran en la Tabla 5, e incluye 6 cultivos iniciadores comerciales (SACCO) y 10 cepas de recolección de cultivos, incluidos como controles 2 bacterias probióticas ampliamente estudiadas (*L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG). Para obtener un stock de bacterias, las cepas liofilizadas se cultivaron tres veces en caldo MRS (Difco, Sparks, MD, EE. UU.) a 37 °C durante 18 h, mientras que los cultivos crio-conservados que fueron donados se cultivaron dos veces en las mismas condiciones. Las bacterias se almacenaron a -80 °C en solución salina de buffer de fosfatos (PBS) con glicerol al 20%. Antes de cada prueba las bacterias se cultivaron en caldo MRS durante 18 h a 37 °C para obtener un cultivo activo.

Tabla 5. Microorganismos puestos a prueba, la fuente de donde se obtuvieron y su código asignado.

Especies	Colección*	Cepa	Código
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM	9843 (299v)	299v
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC	14917	Lp 17
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sacco (LMG)	P-20353	B112
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sacco	V3	V3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC	53103 (GG)	GG
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Sacco (DSM)	21690	SP1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ATCC	11842	Ld42
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Sacco (DSM)	21471	SP5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ATCC	9649	Ld49
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC	393	Lc93
<i>Lactobacillus casei</i>	LMG	6904	Lc04
<i>Lactobacillus casei</i>	Sacco (LMG)	P-20352	B93
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC	10830a	Lm0a
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sacco (DSM)	17742	La3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC	4356	La56
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC	11454	Ll54

*DSM: colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celuláres GmbH.

6.3.2. Resistencia a fluidos gástricos e intestinales simulados

Todas las bacterias en la Tabla 5 se probaron para determinar la resistencia a los fluidos gástricos e intestinales *in vitro* según el método de Guan (2017) con algunas

modificaciones. Las bacterias se cultivaron durante 18 h a 37 ° C. Las células de 2 ml de cultivo se recolectaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos y se lavaron en solución salina estéril (0.5%). Las células se suspendieron en solución salina para ajustar la turbidez al No. 5 de McFarland (10^9 UFC / ml). Las suspensiones de cultivo se diluyeron en solución salina (200 y 1800 μ l respectivamente) para obtener el recuento inicial. El número de unidades formadoras de colonias se determinó realizando diluciones en serie en solución salina con peptona, seguido de la siembra en superficie de 100 μ l en agar MRS.

Para evaluar la resistencia a los fluidos gástricos, se inocularon 200 μ l de suspensión de cultivo de bacterias en 1800 μ l de solución gástrica simulada (0,5% de NaCl, 0,3% de pepsina (Sigma-Aldrich MO, EE. UU.), pH 2.5). Se evaluó la supervivencia después de 1.5 h de incubación a 37 ° C y se determinaron las unidades formadoras de colonia bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

La solución intestinal simulada consistió en 0.5% de NaCl, 0.2% de pancreatina (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) y 0.5% de sales biliares (MCD Lab, México) a un pH ajustado a 8.0. Se inoculó un volumen de 200 μ l de suspensión de cultivo de bacterias en 1800 μ l de solución intestinal simulada y se incubó 2h a 37 ° C. Después de eso, se determinó la supervivencia bacteriana en unidades formadoras de colonia.

6.3.3. Sensibilidad a antibióticos

Para los siguientes experimentos se seleccionaron las seis cepas más resistentes de acuerdo con los resultados de supervivencia fluidos gástricos e intestinales. Se siguió el método de difusión en disco (Bauer et al. 1966) para evaluar la resistencia a antibióticos, y se realizó de acuerdo con las pautas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2007). El cultivo previamente activado se sembró en placa en agar MRS y se incubó 48 h a 37 ° C, después de eso, las colonias se tomaron en PBS hasta que la turbidez coincidió con el estándar de 0.5 de McFarland. Inmediatamente, se inoculó el cultivo estandarizado en agar MRS con un hisopo en tres direcciones y luego se aplicó un disco con múltiples antibióticos (Bio-Rad S.A., México). Cada multidisco de antibiótico contenía: cefalotina, 30 μ g; eritromicina, 15 μ g; trimetoprima + sulfametoxazol, 25 μ g; ceftriaxona, 30 μ g; netilmicina, 30 μ g; cloranfenicol, 30 μ g; ampicilina, 10 μ g; enoxacina, 10 μ g; penicilina,

10 µg; amikacina, 30 µg; gentamicina, 10 µg; y dicloxacilina, 1 µg. Las placas con discos de antibióticos se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Después de 24h, se midieron con vernier los diámetros de las zonas de inhibición. Como control de calidad, se incluyó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las pruebas como cepa de referencia positiva usando agar Mueller-Hinton y leyendo los resultados después de 18 h de incubación. Los diámetros de las zonas de inhibición se clasificaron como susceptibles, intermedios o resistentes según Bruslik et al., (2015). La interpretación de los resultados de *Staphylococcus aureus* se realizó de acuerdo con las tablas de puntos de quiebre publicados en las guías del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) (CLSI 2019).

6.3.4. Adhesión a las células Caco-2

Para esta prueba se preparó un cultivo activo como se describió previamente, se centrifugó a 3300g por 5 min y se lavó dos veces con solución salina de buffer de fosfatos; finalmente, las bacterias se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)–F-12 (Invitrogen) con ajuste de pH a 4.5 y se diluyeron 1:10. La línea celular Caco-2, comprada en la Colección Americana de Cultivos, se cultivó en medio DMEM-F-12 con 5% de suero fetal bovino (FBS) en placas de cultivo a 37 ° C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Se alcanzó una confluencia del 90% una semana después de la siembra, se contaron las células para inocular placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en una concentración de 1x10⁵ células por pocillo. Los cultivos se incubaron en medio DMEM-F12 con FBS al 5% para obtener confluencia y se mantuvieron durante 2 semanas más antes de su uso en los ensayos de adhesión. El medio de cultivo celular se cambió cada 2 días.

Los experimentos para evaluar la adhesión de cepas de lactobacilos se llevaron a cabo mediante ensayo de adhesión descrito por Lebeer et al. (2012). Para el ensayo de adhesión se retiró el medio y cada pocillo se inoculó con 0.5 ml de cultivo bacteriano y las células se dejaron en incubación a 37 °C durante 1.5 h. Las células se enjuagaron dos veces con PBS precalentado a 37 ° C y se trataron con tritón X-100 al 1% (Sigma, EE. UU.). A continuación, se tomaron 0.2 ml de suspensión celular, se preparó un conjunto de diluciones en serie y se sembró en placa en agar MRS. Se contaron las colonias después

de la incubación a 37 °C durante 48 h. El porcentaje de adhesión se calculó comparando el número total de colonias bacterianas contadas después de la adhesión con el número de colonias bacterianas en la suspensión añadida a los pocillos de la placa de cultivo de tejidos. Se incluyó *Salmonella enterica* ATCC 13311 en la prueba de adhesión como control. Se realizaron tres experimentos independientes en los que todas las cepas se probaron por triplicado.

6.3.5. Fermentación de prebióticos

Se seleccionaron las dos cepas que exhibieron el mejor comportamiento en todas las pruebas anteriores para evaluar su capacidad de fermentar fibras prebióticas. En este experimento se utilizaron dos fibras: inulina (Orafti® HIS, Beneo), que es un prebiótico bien reconocido y estudiado; y fibra soluble de maíz (PROMITOR™ Soluble Corn Fiber 85, Tate & Lyle). Las formulaciones de los caldos MRS del control, inulina y fibra soluble de maíz (SCF) se muestran en la Tabla 6. A manera de control se usó la formulación típica de caldo MRS con solo una modificación, se usó la mitad del contenido de dextrosa típico para limitar la disponibilidad del azúcar, debido a que la concentración habitual podría evitar que se observara la fase de muerte en las curvas de crecimiento. Los medios de cultivo con prebióticos se formularon teniendo en cuenta la pureza declarada por el fabricante de la fibra y el contenido de azúcar residual, para probar la misma concentración de estos componentes en los caldos (la pureza de la inulina y la SCF fue de 88% y 87.5%; y el contenido de azúcar de 12 y 2% respectivamente). El contenido final de azúcar en medios con inulina o SCF fue de 2.4 g / L. Debido a su menor contenido de azúcar, la formulación de fibra soluble de maíz se complementó con dextrosa para igualar la concentración de azúcar del medio con inulina.

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo MRS para la prueba de (g/L).

Ingrediente	Control	Inulina	SCF*
Peptona	10.0	10.0	10.0
Extracto de res	10.0	10.0	10.0
Extracto de levadura	5.0	5.0	5.0
Dextrosa	10.0	-	2.0
Inulina / SCF	-	20.0	18.0
Polysorbato 80	1.0	1.0	1.0

Citrato de amonio	2.0	2.0	2.0
Acetato de sodio	5.0	5.0	5.0
Sulfato de magnesio	0.1	0.1	0.10
Sulfato de maganeso	0.05	0.05	0.05
Fosfato dipotásico	2.0	2.0	2.0

*SCF: Fibra soluble de maíz

Teniendo en cuenta que los prebióticos son fermentados por los probióticos después de su paso por el intestino delgado, todos los medios de cultivo fueron sometidos a digestión simulada según un método reportado anteriormente (Wang et al. 2017) con algunas modificaciones. Primero, se hirvieron y templaron a temperatura ambiente 250 ml de caldos recién preparados, se ajustó el pH de cada medio a 6.9, se añadieron 65 mg de α -amilasa y posteriormente los caldos se incubaron a 37 °C, a 150 rpm durante 5 min. Luego, el pH se ajustó a 2.0, se añadieron 125 mg de pepsina seguido de incubación a 37 °C, a 150 rpm durante 30 min. Finalmente, el pH se ajustó a 5.3, se añadieron 125 mg de pancreatina y la incubación se llevó a cabo a 37 °C, a 150 rpm durante 30 min. Transcurrido el tiempo, los caldos se esterilizaron en autoclave para evitar la fermentación por bacterias distintas de la cepa para probar.

Los caldos se inocularon con cultivo activo a aproximadamente 3×10^4 UFC / ml y luego se incubaron 48 h a 37 °C en una incubadora con vacío (VWR, México) para fermentar en condiciones anaeróbicas. Se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 20, 28, 36, 48 h y se examinaron para determinar la acidez titulable (expresada como contenido de ácido láctico), °Brix y pH. Una fracción de cada muestra se almacenó a -20 °C para posterior análisis de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y para la PCR. El contenido de bacterias durante la fermentación se cuantificó por PCR cuantitativa en tiempo real. El kit DNeasy microbiano UltraClean (Qiagen) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para extraer ADN de 1.8 ml de muestra de caldo fermentado. Para la extracción del ADN, las células se lisaron a través de una combinación de fuerza mecánica, calor y detergente, se unen a un filtro de sílice y se lavan. El ADN resultante se recupera en 50 μ l de solución tampón Tris. Se usaron los cebadores LacF (secuencia 5'-GGAAACAGRTGCTAATACCG-3') y LacR (secuencia 5'-CACCGCTACACATGGAG-3') (Eurofins), que reconocen el gen 16S rRNA de todas las

bacterias del genero *Lactobacillus* (Walter et al., 2001). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl que contenía una mezcla de SYB Green (Applied Biosystems), ambos cebadores (cada uno a una concentración de 500 nM), 15 ng de ADN purificado y agua molecular. La amplificación (10 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 10 s a 95 °C, 15 s a 61 °C y 20 s a 72 °C) y la detección se llevaron a cabo en un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). La cantidad de ADN genómico extraído se determinó por espectrofotometría ultravioleta a 260 nm (NanoDrop®, EE. UU.) y la pureza se verificó por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El umbral del ciclo (CT) se calculó como el número de ciclo en el que la reacción se volvió exponencial. El umbral del ciclo de cada muestra se comparó luego con una curva estándar hecha mediante la dilución del ADN genómico de los cultivos de *L. plantarum* 299v.

6.3.6. Formación de ácidos grasos de cadena corta.

Se usó cromatografía de gases para identificar si las bacterias seleccionadas eran capaces de producir ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación de las fibras. Los medios de cultivo fermentados se centrifugaron a 4 °C a 10.000 rpm durante 10 minutos y se filtraron a través de filtros de jeringa de PTFE hidrófilo de tamaño de poro de 0.45 µm (Shimadzu, USA) para purificarlos.

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un sistema GC Agilent 6850 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un muestreador automático de líquidos (Agilent, EE. UU.). Se empleó una columna de polietilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico (HP-FFAP, J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., EE. UU.) de 25 m de largo x 0.32 mm de diámetro interno recubierta con una película de 0.50 µm de grosor. Se suministró helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1.0 ml / min. La temperatura inicial del horno fue de 120 °C, se mantuvo durante 2.0 min, posteriormente se elevó hasta 240 °C a velocidad de 15 °C /min y se mantuvo esta temperatura durante 5.0 min. Se insertó lana de vidrio (Supelco) en el liner de vidrio del puerto de inyección. La temperatura del FID y el puerto de inyección fueron de 300 y 240 °C, respectivamente. Los caudales de hidrógeno, aire y helio como gas de reposición fueron 40, 400 y 14 ml / min, respectivamente. El volumen de muestra inyectado para el análisis de GC fue de 1 µl, y el tiempo de ejecución para cada análisis fue de 20.7 min. El manejo de datos se realizó

con un software OpenLAB CDS ChemStation (Agilent). Una mezcla de solución estándar analítica (Supelco, EE. UU.) que contiene ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico, ácido hexanoico y ácido n-heptanoico, todos ellos a una concentración de 10 mM, se utilizó para identificar AGCC en cromatogramas por sus tiempos de retención específicos. La solución estándar stock se almacenó a 4 ° C hasta su uso. Se obtuvieron curvas de calibración individuales para cada compuesto usando la mezcla AGCC, para esto, el día del análisis la solución estándar se diluyó adecuadamente para dar concentraciones en serie que cubren el rango deseado. A partir de los cromatogramas, el área bajo la curva se graficó frente a la concentración del AGCC para obtener la ecuación de la curva para cada compuesto.

6.3.7. Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron al menos tres veces como repeticiones independientes y todos los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas entre cepas, tiempos o tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y prueba de Tukey. El nivel de significancia estadística se definió como $p < 0.05$. Los datos se analizaron en el software estadístico Minitab 17.

6.4. Resultados

6.4.1. Resistencia a fluidos gástricos e intestinales simulados.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la reducción en los recuentos de bacterias después la incubación de cada cepa en condiciones gástricas o intestinales simuladas. Los recuentos de cultivo iniciales fueron de 7.2 ± 0.6 log (UFC / ml) para todas las pruebas. Las bacterias más resistentes a las condiciones gástricas fueron *Lactobacillus acidophilus* La3, *L. plantarum* V3, *L. acidophilus* L56, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v y *L. casei* B93 en ese orden. Al comparar entre especies, se pudo notar que ambas cepas de *L. acidophilus* se encontraban entre las reducciones más bajas en la viabilidad después de exponerse a condiciones gástricas; por el contrario, las tres cepas de *L. delbrueckii* pueden agruparse entre las reducciones más altas. No obstante, considerando todo el conjunto de datos, los resultados sugieren un comportamiento dependiente de la cepa en lugar de uno dependiente de la especie, como la evidencia de *L. plantarum* con 5 cepas que muestran

resultados de supervivencia altamente variados. Por otro lado, ninguna de las cepas mostró una disminución dramática en los recuentos viables después de su incubación en condiciones intestinales. *L. plantarum* B112, *L. casei* Lc93, *L. acidophilus* La3, *L. plantarum* Lp17, *L. casei* Lc04 y *L. delbrueckii* SP5 fueron las cepas más resistentes al fluido intestinal. Debido a su baja reducción después de exponerse a las condiciones del tracto gástrico e intestinal, las bacterias *L. acidophilus* La3, *L. plantarum* V3, *L. acidophilus* L56, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v y *L. casei* B93 fueron seleccionadas para evaluar su resistencia a los antibióticos y capacidad de adhesión a células CaCo-2.

Tabla 7. Reducción logarítmica de bacterias tras su exposición a condiciones gástricas o intestinales in vitro.

Bacteria	Código	Gástricas	Intestinales
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La3	1,05 ± 0,31 i	0,10 ± 0,02 f
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La 56	2,03 ± 0,13 h	1,61 ± 0,14 a
<i>Lactobacillus casei</i>	B 93	5,11 ± 0,45 e,f	0,81 ± 0,17 b
<i>Lactobacillus casei</i>	Lc 93	7,63 ± 0,08 a	0,07 ± 0,01 f
<i>Lactobacillus casei</i>	Lc 04	5,47 ± 0,39 e	0,12 ± 0,05 f
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	SP 5	6,82 ± 0,28 b,c	0,16 ± 0,02 e,f
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ld 42	6,65 ± 0,40 b,c,d	0,37 ± 0,09 c,d,e
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ld 49	6,35 ± 0,03 c,d	1,00 ± 0,04 b
<i>Lactobacillus plantarum</i>	V3	1,76 ± 0,89 h,i	0,21 ± 0,06 d,e,f
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B 112	4,10 ± 0,40 g	0,05 ± 0,01 f
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299 v	4,50 ± 0,35 f,g	0,18 ± 0,04 e,f
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lp 29	5,69 ± 0,21 d,e	0,43 ± 0,07 c,d
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lp 17	6,98 ± 0,41 a,b,c	0,10 ± 0,01 f
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SP 1	6,98 ± 0,30 a,b,c	0,52 ± 0,15 c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Lr 03	7,33 ± 0,02 a,b	0,25 ± 0,04 d,e,f
<i>Lactococcus lactis</i>	Ll 54	7,02 ± 0,18 a,b,c	0,36 ± 0,03 c,d,e
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lm 0a	7,49 ± 0,27 a,b	0,17 ± 0,01 e,f

*Medias en la misma columna que no comparten letra son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey p < 0.05).

6.4.2. Sensibilidad a los antibióticos

Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3, *L. casei* B93, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v, *L. acidophilus* La56 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (control) se muestran en la Tabla 8. Todas las cepas de *Lactobacillus* fueron resistentes a cefalotina, ampicilina, enoxacina,

penicilina, amikacina, gentamicina y dicloxacilina. *L. acidophilus* 56 fue la cepa más resistente a los antibióticos, teniendo sensibilidad intermedia para la ceftriaxona y el cloranfenicol y resistente para el resto de los antibióticos probados. *L. casei* B93 fue el único lactobacilo resistente a la ceftriaxona, en adición, fue resistente a la netilmicina como *L. acidophilus* 56. Por otro lado, *L. plantarum* 299v fue la cepa más susceptible a antibióticos, resultando con sensibilidad intermedia para eritromicina y netilmicina y siendo susceptible a trimetoprima + sulfametoxazol, ceftriaxona y cloranfenicol; es notable que fue la única cepa de lactobacilos susceptible a trimetoprima + sulfametoxazol. Los perfiles de *L. plantarum* B112 y *L. plantarum* 299v fueron similares, excepto para trimetoprima + sulfametoxazol. *Lactobacillus plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 presentaron el mismo perfil de susceptibilidad a antibióticos: sensible a la ceftriaxona; intermedio para eritromicina, netilmicina y cloranfenicol; y resistente a todos los demás antibióticos probados.

Tabla 8. Perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3, *L. casei* B93, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v, *L. acidophilus* 56 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (control).

Cepa	Diámetro del halo de inhibición (mm)											
	CF*	E	SXT	CRO	NET	CL	AM	ENX	PE	AK	GE	DC
V3	0 ± 0	17.3 ± 0.2 (I)	0 ± 0	28.9 ± 0.2 (S)	12.6 ± 0.1 (I)	19.1 ± 0.4 (I)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
La3	0 ± 0	15.4 ± 0.3 (I)	0 ± 0	27.7 ± 0.3 (S)	11.9 ± 0.2 (I)	17.6 ± 0.2 (I)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
B93	0 ± 0	24.0 ± 0.5 (S)	0 ± 0	0.0 ± 0.0 (R)	10.7 ± 0.2 (R)	26.7 ± 0.1 (S)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
B112	0 ± 0	17.7 ± 0.4 (I)	0 ± 0	36.1 ± 0.1 (S)	11.2 ± 0.3 (I)	27.3 ± 0.1 (S)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
299v	0 ± 0	14.9 ± 0.1 (I)	24.6 ± 0.3 (S)	31.8 ± 0.0 (S)	11.2 ± 0.3 (I)	25.6 ± 0.1 (S)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
La56	0 ± 0	0.0 ± 0.0 (R)	0 ± 0	18.2 ± 0.0 (I)	8.3 ± 0.4 (R)	9.1 ± 0.0 (I)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Control	22.5 ± 0.6	19.7 ± 0.1 (I)	28.7 ± 0.1 (S)	16.6 ± 1.2 (I)	22.8 ± 0.4 (S)	22.8 ± 0.2 (S)	0 ± 0	23.3 ± 0.5	0 ± 0	22.6 ± 0.5	19.6 ± 0.0	0 ± 0

* CF: cefalotina (30 µg); E: eritromicina (15 µg); SXT: trimetoprima-sulfametoxazol (25 µg); CRO: ceftriaxona (30 µg); NET: netilmicina (30 µg); CL: cloranfenicol (30 µg); AM: ampicilina (10 µg); ENX: enoxacina (10 µg); PE: penicilina (10 µg); AK: amikacina (30 µg); GE: gentamicina (10 µg); DC: dicloxacilina (1 µg).

6.4.3. Adhesión a las células CaCo-2

La Figura 6 presenta el porcentaje de adhesión a células CaCo-2 de las cepas con la mejor supervivencia gástrica e intestinal, mencionadas anteriormente. Todas las bacterias analizadas tienen la capacidad de adherirse a las células CaCo-2. *Lactobacillus plantarum* V3 y *Salmonella enterica* ATCC 13311 mostraron la adhesión más alta, siguiendo en orden *L. acidophilus* La3, *L. acidophilus* La56, *L. plantarum* 299v, *L. casei* B93 y *L. plantarum* B112. *Lactobacillus plantarum* V3 no tuvo diferencias significativas con *Salmonella enterica* ATCC 13311, la bacteria de control positivo. También es interesante que todas las bacterias fueran tan adherentes como *L. plantarum* 299v o incluso mejores.

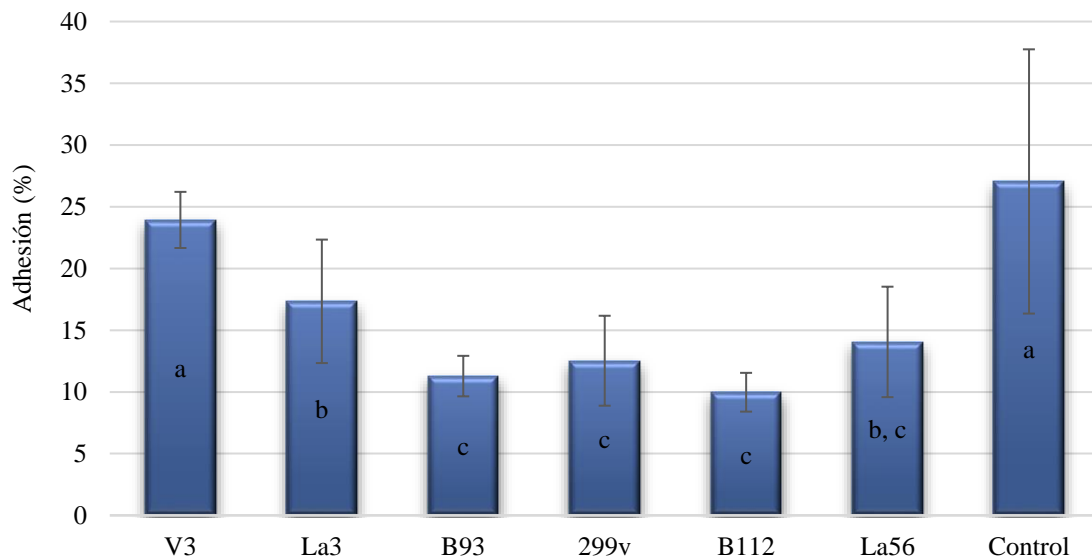
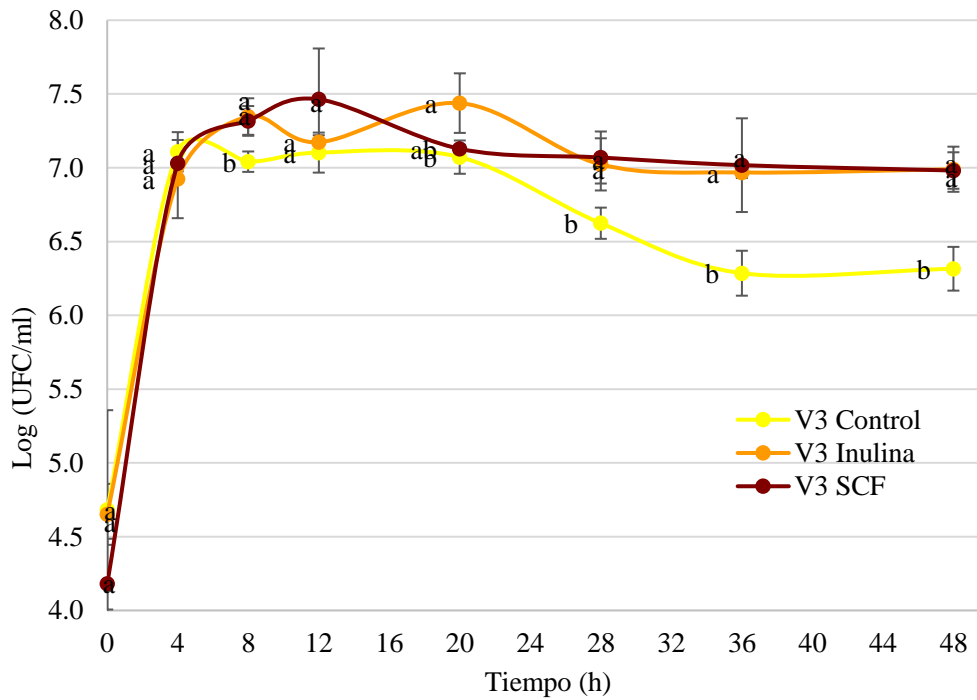


Figura 6. Adhesión de las bacterias *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3, *L. casei* B93, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v, *L. acidophilus* 56 y *Salmonella enterica* ATCC 13311 (control) a células de epitelio intestinal humano Caco-2. Las medias sin letras en común dentro de la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

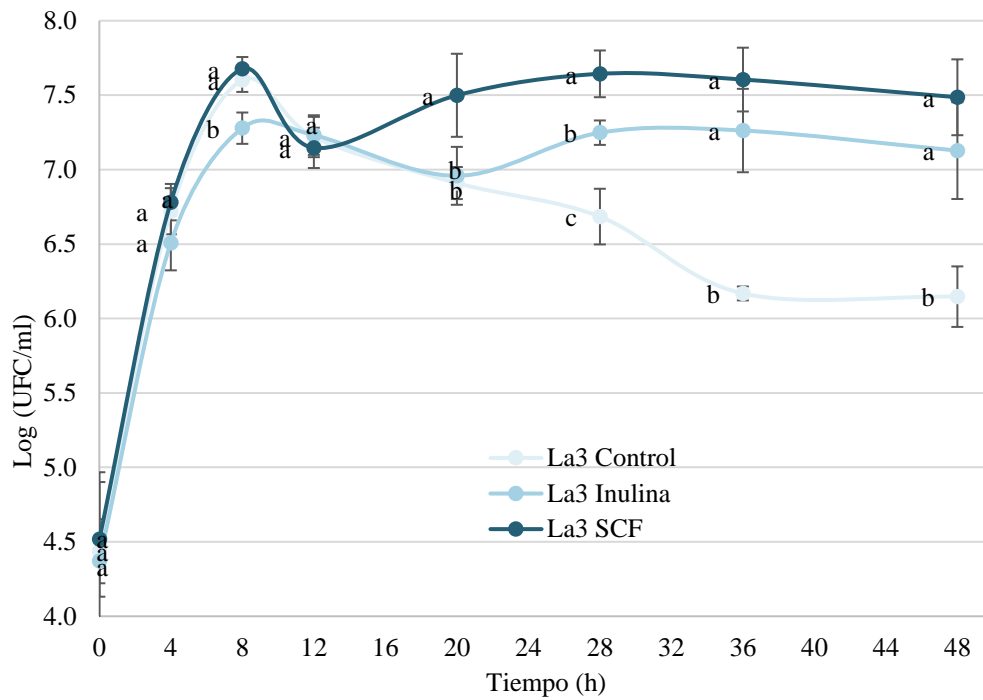
6.4.4. Fermentación de prebióticos

L. plantarum V3 y *L. acidophilus* La3 fueron seleccionados en base a que mostraron el mejor comportamiento en las evaluaciones *in vitro* de las características probióticas. Las cinéticas de crecimiento de las bacterias durante la fermentación de dextrosa, inulina o fibra de maíz soluble, se observan en la Figura 7. En los tratamientos control se añadió dextrosa en una cantidad limitada para apreciar la fase de muerte, evidenciada en la Figura 7 como una disminución en el crecimiento. Se demostró la capacidad de la inulina y la

SCF para soportar el crecimiento de *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3. Todos los tratamientos prebióticos manifiestan un crecimiento diauxico durante la fermentación, un tipo de crecimiento que a menudo se observa cuando los microorganismos se cultivan en un medio químicamente definido que contiene dos azúcares. *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 pudieron crecer en ambas fibras y el mayor crecimiento se logró con *L. acidophilus* La3 en medio con SCF. *L. plantarum* V3 exhibe un crecimiento máximo similar en ambas fibras, pero la adaptación, vista como la duración de la segunda fase de lag, fue más rápida en el medio con SCF. Por otro lado, *L. acidophilus* La3 presenta un mayor crecimiento y una adaptación más rápida en SCF que en inulina.



a)



b)

Figura 7. Cinética del crecimiento durante la fermentación de dextrosa (control), inulina o fibra de maíz soluble (SCF) por *Lactobacillus plantarum* V3 (a) y *Lactobacillus acidophilus* La3 (b). Tratamientos con letras diferentes significa que son significativamente diferentes para el mismo tiempo ($p < 0.05$).

En la Tabla 9 se muestran los parámetros fisicoquímicos de las fermentaciones de prebióticos. El cambio en el pH con el tiempo varió con el tratamiento, pero no entre las bacterias. Ambos controles mostraron una disminución más pronunciada en el pH que los tratamientos con prebióticos. Mientras tanto, la acidez aumentó durante las primeras 8 h de fermentación, luego, prácticamente no hubo cambios, excepto para *L. plantarum* V3 en el medio control, donde la acidez aumentó durante las primeras 12 h. Además, se aprecia que *L. plantarum* V3 mostró una mayor acidez en comparación con *L. acidophilus* La3 para cada tratamiento. *L. acidophilus* La3 prácticamente no tuvo diferencia en la acidez entre tratamientos. Los °Brix no variaron mucho con respecto al tiempo para cada tratamiento. Ambos controles dieron valores de °Brix más bajos que los tratamientos con prebióticos y todos tratamientos con prebióticos no mostraron diferencias entre sí.

6.4.5. Producción de ácidos grasos de cadena corta

Las concentraciones de AGCC durante la fermentación de dextrosa, inulina o SCF por *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 se muestran en la Tabla 10. El ácido acético fue el AGCC principalmente producido en todas las fermentaciones, y consiste en 98.7% del total de AGCC cuantificados. Los ácidos isocaproico, isovalérico y butírico, en ese orden, fueron los más abundantes de los compuestos restantes. Los tratamientos que produjeron más AGCC fueron las fermentaciones de inulina con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3. En contraste, los tratamientos con menos producción de AGCC fueron fermentaciones de dextrosa con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3. La concentración de ácido acético disminuyó a lo largo del tiempo en las fermentaciones de dextrosa por *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3, pero permanecen constantes en las fermentaciones de inulina y SCF, como reflejo de esto, se observaron valores significativamente más altos de este compuesto después de 48 h de fermentación en los tratamientos con fibra que en los tratamientos con dextrosa. Mientras tanto, los contenidos de ácido propiónico permanecen constantes en las fermentaciones de inulina y SCF por *L. plantarum* V3 y en la fermentación de SCF por *L. acidophilus* La3, pero en la fermentación de inulina por *L. acidophilus* La3 el ácido propiónico desapareció en 12 y 28 h y finalmente se encontró en 48 h en alta cantidad. En el tiempo final, las fermentaciones de inulina mostraron un mayor contenido de ácido propiónico que las fermentaciones de dextrosa y SCF. El ácido butírico solo varió entre tratamientos a las 48 h, el contenido fue mayor en SCF por *L. acidophilus* La3 y menor en la fermentación de SCF por *L. plantarum* V3. No se encontraron diferencias significativas en la producción de ácidos acético, propiónico ni butírico entre bacterias para la misma fuente de carbono en ningún momento.

Tabla 9. Cambios en el pH, acidez y °Brix durante la fermentación de medios MRS con dextrosa, inulina o fibra soluble de maíz (SCF) por *Lactobacillus plantarum* V3 and *Lactobacillus acidophilus* La3.

Bacteria/ análisis	Fuente de carbono	Tiempo (h)							
		0	4	8	12	20	28	36	48
<i>Lactobacillus plantarum</i> V3									
pH	Dextrosa	5.31 ± 0.03	5.22 ± 0.09	4.35 ± 0.20	3.92 ± 0.01	3.92 ± 0.06	3.94 ± 0.01	3.97 ± 0.03	3.93 ± 0.03
	Inulina	5.36 ± 0.05	5.26 ± 0.08	4.68 ± 0.07	4.62 ± 0.07	4.59 ± 0.09	4.60 ± 0.05	4.62 ± 0.05	4.59 ± 0.08
	SCF	5.34 ± 0.04	5.22 ± 0.08	4.66 ± 0.14	4.50 ± 0.06	4.49 ± 0.06	4.52 ± 0.03	4.55 ± 0.03	4.52 ± 0.06
Acidez	Dextrosa	0.57 ± 0.05	0.59 ± 0.05	1.08 ± 0.06	1.31 ± 0.08	1.34 ± 0.07	1.34 ± 0.07	1.35 ± 0.06	1.40 ± 0.08
	Inulina	0.54 ± 0.00	0.60 ± 0.07	0.87 ± 0.05	0.86 ± 0.05	0.86 ± 0.05	0.86 ± 0.08	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.04
	SCF	0.41 ± 0.20	0.47 ± 0.20	0.66 ± 0.31	0.65 ± 0.30	0.64 ± 0.29	0.67 ± 0.30	0.65 ± 0.30	0.66 ± 0.31
°Brix	Dextrosa	5.09 ± 0.13	5.33 ± 0.32	5.27 ± 0.12	5.14 ± 0.07	5.42 ± 0.41	5.17 ± 0.11	5.27 ± 0.12	5.08 ± 0.15
	Inulina	6.11 ± 0.31	6.34 ± 0.44	6.46 ± 0.19	6.42 ± 0.12	6.43 ± 0.16	6.39 ± 0.20	6.51 ± 0.13	6.37 ± 0.20
	SCF	6.07 ± 0.31	6.29 ± 0.48	6.41 ± 0.11	6.36 ± 0.17	6.31 ± 0.19	6.36 ± 0.21	6.39 ± 0.09	6.28 ± 0.22
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La3									
pH	Dextrosa	5.35 ± 0.04	5.22 ± 0.07	4.38 ± 0.20	3.92 ± 0.02	3.91 ± 0.05	3.93 ± 0.03	3.93 ± 0.02	3.93 ± 0.02
	Inulina	5.37 ± 0.05	5.25 ± 0.07	4.69 ± 0.10	4.62 ± 0.07	4.59 ± 0.08	4.61 ± 0.05	4.59 ± 0.07	4.60 ± 0.08
	SCF	5.34 ± 0.05	5.23 ± 0.08	4.66 ± 0.13	4.49 ± 0.05	4.49 ± 0.06	4.52 ± 0.03	4.53 ± 0.03	4.52 ± 0.05
Acidez	Dextrosa	0.31 ± 0.18	0.35 ± 0.18	0.50 ± 0.28	0.48 ± 0.27	0.48 ± 0.27	0.51 ± 0.29	0.50 ± 0.28	0.51 ± 0.29
	Inulina	0.22 ± 0.14	0.25 ± 0.15	0.36 ± 0.22	0.35 ± 0.22	0.35 ± 0.22	0.36 ± 0.21	0.36 ± 0.22	0.36 ± 0.23
	SCF	0.17 ± 0.10	0.20 ± 0.11	0.28 ± 0.16	0.27 ± 0.15	0.27 ± 0.15	0.29 ± 0.16	0.28 ± 0.16	0.29 ± 0.16
°Brix	Dextrosa	5.22 ± 0.52	5.49 ± 0.32	5.42 ± 0.08	5.22 ± 0.12	5.22 ± 0.04	5.20 ± 0.12	5.29 ± 0.11	5.19 ± 0.18
	Inulina	5.83 ± 0.46	6.31 ± 0.37	6.33 ± 0.16	6.33 ± 0.13	6.64 ± 0.37	6.32 ± 0.19	6.34 ± 0.12	6.27 ± 0.23
	SCF	6.09 ± 0.39	6.59 ± 0.18	6.42 ± 0.18	6.39 ± 0.16	6.30 ± 0.21	6.34 ± 0.24	6.36 ± 0.19	6.31 ± 0.21

Tabla 10. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (mMol/L) en cinéticas de fermentación de medios MRS con dextrosa, inulina o fibra soluble de maíz (SCF) por dos bacterias ácido lácticas.

Bacteria/ Substrato	Tiempo (h)	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido isobutírico	Ácido butírico	Ácido isovalerico	Ácido valerico	Ácido isocaproico	Ácido caproico	Ácido n- heptanoico
<i>Lactobacillus plantarum</i> V3										
Dextrosa	0	87.98 ± 7.60 ^{a*}	0.15 ± 0.05 ^{a*}	0.11 ± 0.01 ^{a*+}	0.22 ± 0.02 ^{a*}	0.15 ± 0.01 ^{a/}	0.16 ± 0.00 ^{a*}	0.16 ± 0.01 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.11 ± 0.02 ^{a*}
	12	67.60 ± 15.77 ^{ab*}	0.02 ± 0.02 ^{b*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.16 ± 0.01 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.19 ± 0.04 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.03 ± 0.04 ^{a*}
	28	57.60 ± 11.95 ^{ab+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.15 ± 0.07 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a+}	0.06 ± 0.09 ^{a*}	0.14 ± 0.03 ^{a+}	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 ^{a*}
	48	63.86 ± 7.32 ^{b*+}	0.00 ± 0.00 ^{b+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.18 ± 0.13 ^{a*+}	0.08 ± 0.11 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a+}	0.19 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ⁺	0.10 ± 0.07 ^{a*+}
Inulina	0	100.52 ± 13.11 ^{a*}	0.48 ± 0.14 ^{a*}	0.17 ± 0.04 ^{a*}	0.18 ± 0.04 ^{a*}	0.58 ± 0.10 ^{a*}	0.13 ± 0.01 ^{a*}	0.19 ± 0.02 ^{a*}	0.12 ± 0.00 ^{ab*}	0.05 ± 0.08 ^{a*}
	12	80.14 ± 25.44 ^{a*}	0.19 ± 0.27 ^{a*}	0.09 ± 0.13 ^{a*}	0.16 ± 0.02 ^{a*}	0.42 ± 0.35 ^{a*}	0.02 ± 0.02 ^{a*}	0.23 ± 0.09 ^{a*}	0.03 ± 0.04 ^{ab*}	0.08 ± 0.04 ^{a*}
	28	89.92 ± 1.52 ^{a*}	0.16 ± 0.23 ^{a*}	0.08 ± 0.11 ^{a*}	0.15 ± 0.02 ^{a*}	0.45 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.25 ± 0.04 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.03 ± 0.04 ^{a*}
	48	92.97 ± 12.57 ^{a*}	0.48 ± 0.06 ^{a*}	0.08 ± 0.11 ^{a*}	0.18 ± 0.04 ^{a*+}	0.93 ± 0.79 ^{a*}	0.50 ± 0.28 ^{a*}	0.90 ± 0.54 ^{a*}	0.51 ± 0.25 ^{a*}	0.57 ± 0.32 ^{a*}
SCF	0	79.51 ± 4.61 ^{a*}	0.16 ± 0.23 ^{a*}	0.06 ± 0.08 ^{a*+}	0.23 ± 0.06 ^{a*}	0.09 ± 0.13 ^{a/}	0.06 ± 0.08 ^{a*}	0.11 ± 0.15 ^{a*}	0.07 ± 0.10 ^{a*}	0.08 ± 0.11 ^{a*}
	12	85.84 ± 7.74 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.24 ± 0.04 ^{a*}	0.04 ± 0.05 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.19 ± 0.03 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.03 ± 0.04 ^{a*}
	28	83.09 ± 8.28 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.28 ± 0.02 ^{a*}	0.04 ± 0.05 ^{a+}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.17 ± 0.04 ^{a*+}	0.03 ± 0.05 ^{a*}	0.07 ± 0.05 ^{a*}
	48	81.44 ± 7.17 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a+}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.09 ± 0.15 ^{a+}	0.13 ± 0.18 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a+}	0.19 ± 0.08 ^{a*}	0.06 ± 0.09 ^{a*+}	0.10 ± 0.03 ^{a*+}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La3										
Dextrosa	0	91.93 ± 9.81 ^{a*}	0.23 ± 0.13 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ⁺	0.23 ± 0.01 ^{a*}	0.17 ± 0.00 ^{a+/-}	0.18 ± 0.03 ^{a*}	0.20 ± 0.03 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.11 ± 0.01 ^{a*}
	12	69.68 ± 3.71 ^{ab*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.16 ± 0.01 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.21 ± 0.02 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.04 ± 0.06 ^{a*}
	28	58.26 ± 11.46 ^{ab+}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.17 ± 0.06 ^{a*}	0.08 ± 0.11 ^{a+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.19 ± 0.01 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 [*]	0.09 ± 0.02 ^{a*}
	48	49.87 ± 21.87 ^{b+}	0.00 ± 0.00 ^{a+}	0.00 ± 0.00 [*]	0.18 ± 0.03 ^{a*+}	0.08 ± 0.11 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b+}	0.21 ± 0.01 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ⁺	0.00 ± 0.00 ^{a+}
Inulina	0	96.03 ± 15.03 ^{a*}	0.31 ± 0.06 ^{a*}	0.17 ± 0.01 ^{a*}	0.18 ± 0.04 ^{a*}	0.49 ± 0.03 ^{a*+}	0.12 ± 0.00 ^{a*}	0.21 ± 0.05 ^{b*}	0.06 ± 0.09 ^{a*}	0.12 ± 0.02 ^{a*}
	12	88.28 ± 3.64 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.19 ± 0.00 ^{a*}	0.44 ± 0.22 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.28 ± 0.09 ^{b*}	0.06 ± 0.09 ^{a*}	0.09 ± 0.03 ^{a*}
	28	80.31 ± 4.16 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.14 ± 0.05 ^{a*}	0.26 ± 0.12 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.19 ± 0.01 ^{b*+}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.12 ± 0.01 ^{a*}
	48	83.28 ± 4.44 ^{a*}	0.42 ± 0.05 ^{a*}	0.15 ± 0.01 ^{a*}	0.20 ± 0.07 ^{a*+}	0.61 ± 0.25 ^{a*}	0.14 ± 0.05 ^{a*+}	0.49 ± 0.03 ^{a*}	0.17 ± 0.06 ^{a*+}	0.19 ± 0.04 ^{a*+}
SCF	0	75.43 ± 11.47 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 ⁺	0.17 ± 0.04 ^{a*}	0.09 ± 0.12 ^{a/}	0.11 ± 0.01 ^{a*}	0.22 ± 0.01 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.05 ± 0.08 ^{a*}
	12	81.11 ± 7.25 ^{a*}	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]	0.20 ± 0.10 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.18 ± 0.00 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.10 ± 0.02 ^{a*}
	28	67.86 ± 9.64 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]	0.19 ± 0.07 ^{a*}	0.07 ± 0.10 ^{a+}	0.00 ± 0.00 ^{b*}	0.20 ± 0.02 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 ^{a*}	0.09 ± 0.02 ^{a*}
	48	71.76 ± 1.57 ^{a*+}	0.00 ± 0.00 ⁺	0.00 ± 0.00 [*]	0.31 ± 0.04 ^{a*}	0.07 ± 0.10 ^{a*}	0.00 ± 0.00 ^{b+}	0.18 ± 0.04 ^{a*}	0.06 ± 0.08 ^{a*+}	0.08 ± 0.03 ^{a*+}

Medias sin letras en común en la misma columna son significativamente diferentes entre el tiempo para cada fuente de carbono y bacteria ($p < 0.05$). Medias sin símbolos en común en la misma columna son significativamente diferentes entre fuentes de carbono para cada tiempo y bacteria ($p < 0.05$).

6.5. Discusión

6.5.1. Resistencia a condiciones gástricas e intestinales

Para ser considerados como probióticos, los microorganismos tienen que cumplir algunos criterios para garantizar su suministro en cantidades suficientes en su sitio de acción para poder tener un efecto beneficioso, por lo que los probióticos deben sufrir y sobrevivir condiciones muy hostiles antes de llegar al tracto intestinal inferior. Por lo tanto, decidimos probar la supervivencia de todas las cepas a condiciones gástricas e intestinales *in vitro*. En concordancia con reportes anteriores (Bautista-Gallego et al. 2013; Koll et al. 2010), la capacidad de las bacterias para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal fue variable y dependiente de la cepa, como se observó en las reducciones de las cinco cepas de *L. plantarum*, que variaron entre 1.76-6.98 log (UFC / ml). Las bacterias ácido lácticas (LAB) se caracterizan por la generación de productos finales de fermentación ácidos y su capacidad para funcionar a pH bajo, a pesar de que son neutrófilos. Las respuestas al estrés en LAB son procesos complejos que involucra varios mecanismos, Van De Guchte et al. (2002) han detallado sus respuestas al estrés y mencionan que el espectro de mecanismos presentes en una especie no siempre es claro, y la presencia de actividades enzimáticas y de eliminación de compuestos puede incluso diferir entre las cepas. Probablemente, la resistencia a las condiciones ácidas y a las sales biliares de cualquier cepa depende de su capacidad individual de uso de varios de los mecanismos de respuesta al estrés adquiridos debido a la evolución adaptativa. *L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG se incluyeron en el presente estudio como cepas de referencia debido a su alta funcionalidad y los múltiples beneficios que aportan a la salud de su hospedero (Connelly 2008; Capurso 2019). Es interesante que *L. rhamnosus* GG demostró altas reducciones en el recuento viable después de exponerse a condiciones gástricas. Monteagudo-Mera y sus colaboradores (2012) probaron a *L. rhamnosus* GG en condiciones gástricas e intestinales simulados a diferentes valores de pH, concentraciones de bilis y tiempos de incubación, encontrando diferentes tasas de supervivencia dependiendo de las condiciones combinadas; es destacable que las reducciones de viabilidad que mencionan se parecen a las encontradas en el presente estudio en condiciones similares. También es notable que *L. acidophilus* La3, *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La56 fueron significativamente más resistentes a los ácidos que *L. plantarum*

299v. Todas las cepas estudiadas mostraron altas tasas de supervivencia a las sales biliares, esto fue concordante con Vinderola y Reinheimer (2003), que encontraron que una gran cantidad de cepas de *L. delbruekii*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. rhamnosus* incluso pudieron crecer al 0.5% de sales biliares (misma concentración utilizada en el presente estudio).

6.5.2. Susceptibilidad a antibióticos

Los antibióticos son uno de los avances más importantes en la medicina moderna, sin embargo, su uso indiscriminado en medicina humana y veterinaria ha llevado a una mayor propagación de la resistencia a los antibióticos y hoy en día existe una preocupación sobre la continuidad de su eficacia en el tratamiento de enfermedades. Comúnmente existe resistencia a los antibióticos entre las bacterias, incluidos los microorganismos probióticos, por lo tanto, cuando se trata de la selección de cepas probióticas es recomendable la determinación de los perfiles de resistencia a los antibióticos, y las bacterias probióticas no deben albergar genes que codifiquen resistencia transmisible a fármacos usados clínicamente (OMS 2002). *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3, *L. casei* B93, *L. plantarum* B112, *L. plantarum* 299v y *L. acidophilus* 56 fueron resistentes a cefalotina, ampicilina, enoxacina, penicilina, amikacina, gentamicina y dicloxacilina, la susceptibilidad para el resto de los antibióticos fue variable entre cepas. Informes anteriores han señalado que los lactobacilos muestran una amplia gama de resistencias a los antibióticos de forma natural (Charteris et al. 1998; Felten et al. 1999). Sin embargo, los patrones de susceptibilidad a los antibióticos varían mucho entre las diferentes especies de lactobacilos. Se han reportado en cepas de lactobacilos una alta incidencia de resistencia a la gentamicina, penicilina y ampicilina, también se ha encontrado resistencia a la kanamicina, vancomicina, meticilina, cloxacilina, ácido nalidíxico, aztreonam, cicloserina, polimixina B y espectinomicina. Por otro lado, se ha documentado que son sensibles a la rifampicina, la bacitracina, la clindamicina y la novobiocina. Finalmente, la susceptibilidad de *Lactobacillus* a cefalotina, eritromicina, cloranfenicol, gentamicina, lincomicina, metronidazol, neomicina, estreptomina, tetraciclina se ha observado que es variable y depende de la especie. (D'Aimmo et al. 2007; Mathur & Singh 2005; Katla et al. 2001). Las cepas de *Lactobacillus* con resistencias

no transmisibles a antibióticos no suelen constituir un problema de seguridad, por ejemplo, varias especies de lactobacilos son intrínsecamente resistentes a la vancomicina y muchas de ellas tienen una larga historia de uso seguro en los alimentos y no hay indicios de que la resistencia a la vancomicina de estos lactobacilos podría transferirse a otras bacterias (Saarela et al. 2000). Para evitar la transferencia indeseable de genes de resistencia a las bacterias endógenas, los probióticos no deben tener una resistencia distinta a la típica esperada para una especie dada (Mathur y Singh 2005). Las bacterias *L. acidophilus* La56 y *L. casei* B93 mostraron la mayor resistencia a los antibióticos, siendo ambas resistentes a la netilmicina, por otra parte, *L. acidophilus* La56 fue la única que presentó resistencia a la eritromicina y *L. casei* B93 fue la única bacteria resistente a la ceftriaxona, estos resultados sugieren que son mutantes resistentes, por lo tanto, se descartaron para las siguientes pruebas. De esta manera, es necesario llevar a cabo más investigaciones que verifiquen la capacidad de las cepas probióticas propuestas o de los cultivos de bacterias iniciadores para actuar como donantes de genes conjugativos de resistencia a antibióticos, para identificar si la resistencia presente en las bacterias es del tipo transferible y poder definir con certeza su seguridad para aplicaciones alimentarias.

6.5.3. Capacidad de adhesión a células CaCo-2

Volviendo al tema del paso de los probióticos a través del tracto gastrointestinal, una vez que llegan al intestino delgado inferior los probióticos deben ser capaces de colonizar para no ser eliminados debido a los movimientos peristálticos, para luego crecer y poder proporcionar beneficios para la salud del hospedero. Se encontró que todas las cepas analizadas cumplieron con el requisito de adherirse al epitelio intestinal. *Salmonella enterica* ATCC 13311, se eligió como control positivo ya que esta especie se caracteriza por su capacidad de adherirse y colonizar el intestino y su patogenicidad se debe en gran medida a esta capacidad (Wagner et al. 2011). En este contexto, es notable que *L. plantarum* V3 pudo adherirse a las células de una manera comparable con *Salmonella enterica* ATCC 13311 ($23.9 \pm 2.3\%$ y $27.0 \pm 10.7\%$ respectivamente). La mayoría de las cepas de *L. plantarum* pueden adherirse a las líneas celulares de origen intestinal porque poseen un mecanismo de adhesión por medio de la unión a manosa (Molin 2001), por ejemplo, se sabe que *L. plantarum* 299v está adaptada para establecerse en la mucosa

intestinal humana, y posee un mecanismo específico para la adhesión que consiste en unirse a un receptor manossilado presente en las células (Johansson et al. 1993; Adlerberth 1996). La competencia por esos receptores entre las cepas de *L. plantarum* y bacterias patógenas, incluida *E. coli*, reduce la adherencia de los patógenos a las células en humanas y de esta manera puede proteger al huésped de una infección (De Vries 2006). Además, *L. plantarum* 299v ha sido reportado como una cepa con alta capacidad de adhesión (Jacobsen et al. 1999; Castro-Rodríguez et al. 2015), por lo que también puede tomarse como referencia. Con esto último en mente, podría considerarse que las bacterias mostraron una capacidad relevante para adherirse al epitelio intestinal (*L. acidophilus* La3 17.3±5.0 %; *L. casei* B93 11.3±1.6 %; *L. plantarum* B112 10.0±1.6 %; *L. acidophilus* La56 14.0±4.5 %), ya que todas exhiben una adhesión similar o mejor en comparación con *L. plantarum* 299v (12.5±3.6 %).

Como resumen de las pruebas *in vitro*, las bacterias *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 destacaron por su capacidad para sobrevivir a las condiciones gástricas e intestinales y su alto porcentaje de adhesión en las células CaCo-2, además, mostraron un perfil de resistencia a los antibióticos habitual para los *Lactobacillus*. También es notable que sus resultados tuvieron un comportamiento similar o incluso mejor al de la conocida bacteria probiótica *L. plantarum* 299v, lo que los convierte en cepas prometedoras. Debido a lo mencionado anteriormente, las cepas *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 fueron seleccionadas para los experimentos de fermentación de fibras potencialmente prebióticas.

6.5.4. Fermentación de fibras

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento diauxico (o diauxi) se puede apreciar en la cinética de fermentación. En diauxi, las bacterias usan los azúcares disponibles secuencialmente, no simultáneamente, lo que resulta en fases de crecimiento separadas. Típicamente, las dos etapas de crecimiento están separadas por una fase de crecimiento detenido, la llamada fase de retraso que implica una pérdida sustancial de crecimiento durante el cambio. El crecimiento diauxico generalmente se interpreta como una adaptación para maximizar el crecimiento de la población en entornos multinutrientes (Chu y Barnes 2016). Por lo tanto, podría suponerse que tanto *L. plantarum* V3 como *L.*

acidophilus La3 crecieron primero usando azúcares que permanecen en fibras purificadas o la dextrosa, luego se sometieron a una fase de adaptación para mantener el crecimiento usando inulina o SCF. Estos resultados muestran la capacidad de *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 para metabolizar inulina y SCF, sin embargo, se observó que ambas bacterias tenían una adaptación más rápida para metabolizar SCF en comparación con la adaptación a inulina, evidenciada por una fase de retraso más corta durante el cambio del uso de azúcares al uso de fibra. Ensayos *in vivo* informan que SCF demostró estimular las bifidobacterias de la microbiota intestinal humana (Costabile et al. 2016). El tamaño molecular o el grado de polimerización o sustitución podrían estar influyendo en la capacidad prebiótica de las fibras; las diferencias estructurales en las fibras podrían afectar la capacidad de las bacterias para degradarlas, se ha reportado previamente que la estructura específica de una fibra dada afecta su papel en el crecimiento bacteriano y la inmunomodulación, por ejemplo, los arabino-xilooligosacáridos derivados del trigo estructuralmente diferentes tienen diferentes propiedades prebióticas de fermentación en intestino de ratas (Van Craeyveld et al. 2008). Además, Mendis et al. (2016) afirmaron que, debido a la variación según el grado de polimerización y la presencia de sustituciones, la estructura de algunas fibras prebióticas es notablemente compleja. Promitor SCF es un polímero de glucosa obtenido de un almidón parcialmente hidrolizado, esta fibra contiene una mezcla de enlaces glucosídicos α 1-6, α 1-4 y α 1-2 que contribuyen a su baja digestibilidad después de la ingestión (Stewart et al. 2010). La inulina tiene una estructura más compleja; su cadena constituida por un número variable de unidades de fructosa, unidas por enlaces β -(2 \rightarrow 1) d-fructosil-fructosa, generalmente termina con una sola unidad de glucosa unida a través de un α -d-glucopiranosilo o enlace α -(1 \rightarrow 2) con en sacarosa (Apolinário et al. 2014). Debido al proceso de hidrólisis, es de esperarse que el SCF tenga un peso molecular más bajo y/o una estructura menos ramificada que la compleja estructura de la inulina, esta diferencia podría causar una fermentación más fácil del SCF por los probióticos.

6.5.5. Formación de ácidos grasos de cadena corta

Algunos polisacáridos no pueden ser digeridos por humanos, llegando intactos al colon, donde son fermentados por distintos grupos de especies bacterianas (*Lactobacillus*,

Bifidobacterium, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, etc.). Como resultado de esta fermentación, en el caso de algunos de estos compuestos, se producen diversos ácidos grasos de cadena corta (AGCC) *in situ* en la luz del colon, principalmente acetato, propionato y butirato. El acetato y el propionato poseen principalmente efectos energéticos para las células eucariotas. El butirato es la fuente de energía preferida para los colonocitos normales, lo que contribuye a su homeostasis normal, y es un fuerte compuesto antitumoral para los colonocitos tumorales, regula las vías de multiplicación celular y promueve las rutas pro-apoptóticas (Fernández et al. 2016). Un probiótico por definición debe tener un efecto benéfico sobre la salud, por lo que evaluamos la producción de AGCC durante la fermentación de inulina y fibra por las bacterias seleccionadas *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3.

Los cambios fisicoquímicos y la curva de crecimiento de los lactobacilos hacen suponer que las rutas metabólicas seguidas por los tratamientos con dextrosa y las de las fibras son diferentes. La pronunciada disminución del pH y la acidez es más alta en las fermentaciones de dextrosa, en comparación con las fermentaciones de las fibras, podría deberse a la formación de compuestos más ácidos (por ejemplo, ácido láctico) contra la formación de compuestos menos ácidos en la fermentación de las fibras (por ejemplo, CO₂ y ácido acético). Adicionalmente, en las fermentaciones de dextrosa no se observó formación de gas a diferencia de lo observado en las fermentaciones de las fibras (datos no cuantificados). Por otra parte, la presencia de AGCC ramificados (isovalerico e isocaproico) evidencia que también hubo fermentación de péptidos o proteína, ya que estos compuestos son exclusivamente originados a partir de los aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina (Koh et al. 2016). Farooq *et al.* 2013 también reportan valores de AGCC al inicio de sus fermentaciones, aunque no se discute a que se debe esto; es relevante mencionar que ellos también hacen una digestión previa de los prebióticos a diferencia de otras referencias en las que no se da dicho pretratamiento, es posible que la formación de los compuestos iniciales se lleve a cabo por bacterias presentes en las fibras durante la digestión previa a la fermentación.

Con anterioridad se ha reportado que algunas bacterias tienen la capacidad de usar ácido acético o láctico para producir ácido butírico (Puertollano et al. 2014), eso podría explicar porque en las fermentaciones con dextrosa, el acético se reduce; y, aunque algunos

compuestos desaparecen, el butírico no disminuye, es posible que el consumo/producción de butírico eviten su completa degradación, sobre todo teniendo en mente que la dextrosa se encuentra en cantidad limitada y se debe acabar en etapas tempranas de la fermentación forzando a las bacterias a usar otras fuentes de carbono.

En las fermentaciones con inulina se observa que la concentración de varios compuestos aumenta hasta las 48 h, es decir en una fase avanzada de la fermentación donde la cantidad de fibra es más limitada. Este efecto se ha visto en estudios previos usando cultivos puros, donde se ha encontrado que la disponibilidad de carbono afecta el tipo de compuestos resultantes de la fermentación y la velocidad de crecimiento, señalando, por ejemplo, que en fermentaciones con Bifidobacterias los productos formados fueron ácido acético y fórmico bajo limitación de carbono, mientras que cuando hay exceso de carbohidratos son producidos acetato y lactato (Macfarlane y Macfarlane 2003).

Aunque en las fermentaciones con SCF las bacterias muestren una adaptación más rápida o incluso un mayor crecimiento, los tratamientos con inulina fueron más efectivos para promover la formación de AGCC. Sin embargo, la fermentación de SCF por *L. acidophilus* La3 dio una producción importante de ácido butírico aun cuando hubo nula o baja producción de otros AGCC; así que, aunque la cantidad de compuestos no es elevada, el tipo de compuestos formados (ácidos acético y butírico) hace a esta una buena combinación de probiótico + prebiótico.

6.6. Conclusiones

La supervivencia a condiciones gástricas e intestinales mostró depender más de la cepa en particular y no se puede atribuir esta característica a todo el género o especie, esto resalta la importancia de probar cepas particulares al proponer un nuevo probiótico. *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3, *L. plantarum* B112 y *L. plantarum* 299v demostraron ser capaces de sobrevivir a condiciones gástricas e intestinales in vitro, tienen la capacidad de adherirse a las células CaCo-2 y no muestran más resistencias a antibióticos de lo requerido entre los antibióticos de los probados, por lo tanto, estas bacterias pueden considerarse probióticos. Las cepas que presentaron las mejores características considerando todas las pruebas fueron *L. plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3, además, mostraron ser capaces de metabolizar inulina y SCF y producir AGCC a

través de la fermentación de estos prebióticos. Es notable que la fase de adaptación de las bacterias, antes de metabolizar los prebióticos, fue más corta en las fermentaciones de SCF en comparación con la adaptación en las fermentaciones de inulina; esto podría deberse a diferencias en la complejidad de las estructuras de las fibras. La mejor combinación simbiótica fue *L. acidophilus* La3 con inulina o SCF debido a que la bacteria puede crecer utilizando estas fibras como fuente de carbono y producir AGCC.

7. CAPÍTULO 2. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO Y TIEMPO DE GERMINACIÓN PARA OBTENER GERMINADO DE MAÍZ SANITARIO, NUTRITIVO Y FERMENTABLE

7.1. Resumen

La germinación de los cereales es comúnmente un paso previo a la fermentación ya que aumenta la disponibilidad de algunos nutrientes facilitando el crecimiento de microorganismos. Se probó la eficacia de la desinfección de los granos con cloro y ácido peracético a diferentes condiciones, a fin de reducir la carga microbiana en los germinados y prevenir degradación. Posteriormente se germinó el maíz durante 5 días para evaluar el cambio en el tiempo del contenido nutrimental, la actividad enzimática y el contenido de azúcares y nitrógeno amino libre, con el objetivo de definir el tiempo de germinación necesario para tener un buen balance en el contenido nutrimental y la fermentabilidad del maíz. Se encontró que el método de desinfección más efectivo con cloro 2% por 5 min seguido de ácido peracético 533 ppm 3 min, obteniendo de este modo un germinado sanitario. El contenido de proteína y fibra del maíz no presentó cambios significativos con la germinación, por otra parte, se aprecia un incremento en el contenido de cenizas y disminución de los lípidos. El nitrógeno amino libre aumenta con el tiempo de germinación presentando un máximo a las 96 h. El contenido de azúcares reductores aumenta a la par de la actividad de las enzimas amilasas durante las primeras 48 h de germinación, después de esto la actividad de las amilasas disminuye y el contenido de azúcares permanece estable, sugiriendo inhibición de las enzimas debido a la acumulación de azúcares. En general, a las 96 h se cuenta con el mejor balance entre nitrógeno amino libre, azúcares reductores y α -amilasas.

7.2. Introducción

Los cereales germinados son empleados desde la antigüedad en la elaboración de bebidas alcohólicas y otras fermentaciones tradicionales, sin embargo, no fue sino hasta años recientes se empezó a difundir el consumo directo de los germinados debido a una actitud positiva cada vez mayor de los consumidores hacia tales productos, que han relacionado con expectativas como alimentos "naturales", "de mejor sabor", "más nutritivos" y "más

saludables" (Mattucci 2015). La Asociación Europea de Semillas Germinadas (ESSA) proporciona la siguiente definición para germinados: "significa el producto obtenido de la germinación de semillas y su desarrollo en agua u otro medio, cosechado antes del desarrollo de hojas verdaderas y que está destinado ser comido entero, incluida la semilla. El proceso de germinación de los granos es iniciado con la absorción de agua, esto promueve el desarrollo de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas. Las α -amilasas se forman vía síntesis *de novo* en las células del escutelo y la aleurona durante la germinación y degradan las reservas de almidón en azúcares fermentables. Por su parte, las enzimas proteolíticas producen el nitrógeno soluble que se requiere para la síntesis de diversas enzimas (Agu 2003). De este modo, durante la germinación el almidón y las proteínas son transformados en azúcares y aminoácidos libres o péptidos de cadena corta, nutrientes más fácilmente asimilables por microorganismos, debido a esto, la germinación de los cereales es comúnmente un paso previo en la elaboración de alimentos fermentados. La germinación de los granos no es solo un modo de obtener material fermentable, sino que puede aprovecharse para producir alimentos o ingredientes con una calidad nutricional mejorada respecto a contraparte sin germinar. Se han llevado a cabo diversas revisiones bibliográficas que reportan los efectos de la germinación en la composición nutricional, digestibilidad, bioaccesibilidad y contenido de compuestos bioactivos y antinutrientales en cereales (Cáceres et al. 2014; Cho y Lim 2016; Hübner y Arendt 2013; Nelson et al. 2013; Nkhata et al. 2018; Lemmens et al. 2019) y estos análisis concluyen que la calidad del grano mejora en general. Se ha encontrado también que los principales factores que afectan la composición del germinado son el genotipo, las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre y las condiciones de germinación, tales como tiempo, pH del agua y temperatura (Benincasa et al. 2019). Por otro lado, los germinados son un reto para la industria ya que las condiciones para su producción son cercanas a las óptimas para el crecimiento de diversos microorganismos, incluyendo patógenos, incluso alrededor del mundo hay un largo historial de brotes de origen alimentario asociados a germinados (Feng 1997). Para tratar de resolver el recurrente problema del crecimiento microbiano en germinados, se han propuesto múltiples tratamientos químicos, físicos y biológicos, sin embargo, los tratamientos químicos siguen siendo los más utilizados en la industria debido a su bajo costo y a que

no suelen requerir equipo muy especializado. Entre los tratamientos químicos con mayor potencial para asegurar la seguridad y calidad de los germinados se encuentran hipoclorito de calcio, ácidos orgánicos, dióxido de cloro (ClO₂), agua oxidante electrolizada y ozono (FAO/WHO 2008; Gil et al. 2016; Sikin et al. 2013). De la información revisada por Sikin et al. 2013 se puede hacer la observación de que el tipo de sanitizante, temperatura y tiempo para la desinfección se debe adecuar a cada tipo de semilla para evitar pérdidas en la viabilidad y calidad de los germinados.

El objetivo de este capítulo fue definir las condiciones de pretratamiento (sanitizado y tiempo y temperatura de remojo) y el tiempo de germinación necesario para obtener germinado de maíz sanitario, nutritivo y fermentable.

7.3. Material y Métodos

7.3.1. Material biológico

El maíz con el que se trabajó fue un híbrido experimental de cruza simple, que es un maíz blanco de nombre comercial HECSBB. Fue cultivado en el Bajío en Celaya, Gto. durante el ciclo primavera-verano 2018 siguiendo las recomendaciones del INIFAP en el Bajío (dosis de fertilización 240-60-30, control pre emergente de maleza, y control químico de plagas, densidad de población de alrededor de 90,000 pl/ha). El grano fue adquirido con la empresa Bioimpulsora de México S. de R.L. de C.V. Una vez recibido el grano, se cribó para separar materia extraña e insectos y posteriormente se almacenó a 4 °C en bolsas herméticas a las que se les retiró todo el aire posible con una aspiradora y estas a su vez se colocaron en un contenedor plástico; se dio este tratamiento a fin de evitar el daño por hongos que podrían crecer debido a la humedad que habitualmente se presenta en los refrigeradores.

7.3.2. Caracterización del grano

Se realizaron pruebas biofísicas asociadas a parámetros de calidad para caracterizar el grano siguiendo los protocolos del según manual de protocolos del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMYT) (Palacios 2018), para la interpretación de los resultados se usaron las tablas dispuestas para ese fin en el manual.

7.3.2.1. Índice de flotación

Para esta prueba se preparó una solución de nitrato de sodio (Desarrollo de Especialidades Químicas, México) al 41% en agua desionizada y se determinó su densidad con un picnómetro usando la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{\rho_s - \rho_v}{\rho_a - \rho_v}$$

Donde ρ_v es el peso del picnómetro vacío, ρ_a el peso del picnómetro lleno con agua desionizada, y ρ_s el peso del picnómetro lleno con la solución de nitrato de sodio. La densidad se ajustó con agua desionizada a 1.250 ± 0.001 g/ml a 25°C . se seleccionaron 100 granos y se colocaron en 500 ml de la solución, se agitó por 30 s, tras permanecer 30 s en reposo, se retiraron con un cucharón perforado los granos que flotaron y se procedió a contarlos.

7.3.2.2. Peso hectolítrico, peso de mil granos y dimensiones

Con ayuda de una tolva de llenado de semillas (Figura 8) se dejó caer libremente el maíz sobre el recipiente de 500 ml hasta que se desbordó. Se eliminó el exceso de grano del recipiente con ayuda de una regla metálica, rasando en zig-zag. Se pesó el recipiente con el grano, se restó el peso del recipiente y posteriormente se multiplico este valor por dos, para expresar el resultado en kg/1. Para la determinación del peso de mil granos, se contó dicha cantidad y se midió el peso. Se tomó una muestra de 100 granos y con un vernier se midió su largo, ancho y grosor

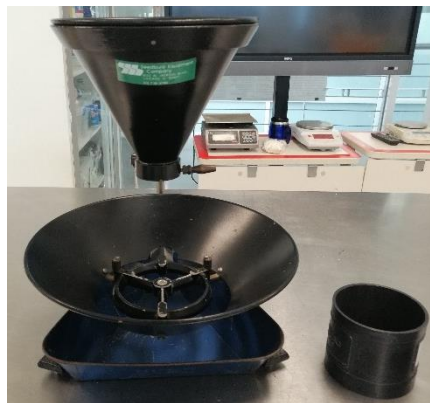


Figura 8. Tolva de llenado de granos empleada para determinar el peso hectolítrico de granos.

7.3.3. Absorción de agua

A fin de calcular el tiempo necesario para que el grano absorba humedad hasta un 35-40 %, el maíz se puso a remojar en agua destilada en relación de peso 1:4 respectivamente a 25 °C por 72 h. Se realizaron muestreos a lo largo del tiempo y se determinó la humedad por el método oficial de la AOAC. Se graficó la humedad del grano versus el tipo de remojo y con la ecuación del grafico se calculó el tiempo necesario para alcanzar una humedad de 30 y 35%. Debido al prolongado tiempo requerido a 25 °C, se realizó la prueba en incubación a 30, 40 y 60 °C bajo las mismas condiciones.

7.3.4. Definición de protocolo de sanitizado

Para desinfectar los granos de maíz y bajar tanto como fuera posible la carga microbiana, se realizaron pruebas con dos sanitizantes ampliamente usados a escala industrial para desinfectar frutas y hortalizas cloro y ácido peracético. Para el cloro se probó con soluciones al 1 y 2 % a partir del sanitizante comercial marca Cloralex (concentración al 4%) diluyendo de manera apropiada, las concentraciones se eligieron tomando en cuenta los documentos oficiales de la USDA sobre desinfección de agroproductos. El ácido peracético a 80 ppm que es la concentración de uso sugerido por el fabricante (Chemikalie Sencol Global S.A. De C.V., México) y a 533 ppm que es la concentración máxima permitida por la FDA para esta aplicación. El maíz se sumergió en las soluciones de manera individual por 3 o 5 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada. El maíz sanitizado se puso en remojo por 41 y 62 h a 25 °C, estos tiempos se definieron según a datos de la curva de absorción de agua a 25 °C. Se realizaron pruebas microbiológicas al maíz recién sanitizado, y a los granos puestos en remojo 41 y 62 h.

7.3.5. Pruebas de germinación

El maíz se sanitizó y se colocó en agua destilada para su remojo, posteriormente los granos se colocaron en charolas con tapa perforada y se incubación a 25 °C por 5 días a > 90% HR en obscuridad. Se realizó un muestreo cada 24 h, en el cual se contó el número de granos germinados (granos que presentaron radícula), se midió la longitud de la radícula con un vernier, posteriormente se molieron los granos en un molino de café y se tomó una

muestra para determinar la humedad, el resto de la muestra se almacenó en tubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

7.3.6. Análisis nutrimental

El análisis nutrimental se realizó conforme a los métodos oficiales de la AOAC (1995) para grasa, fibra cruda y ceniza, la proteína se determinó por el método micro Kjeldhal y los carbohidratos fueron calculados por diferencia. Los reactivos necesarios fueron adquiridos con Desarrollo de Especialidades Químicas, México.

7.3.7. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se extrajeron tres veces usando etanol al 80% (v/v) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes se agruparon y se evaporaron a sequedad en una estufa a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los azúcares reductores se resolubilizaron en agua, se sonicaron y se agitaron en vortex. La cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo de acuerdo al método de Miller (1959) con algunas modificaciones. Para la preparación del reactivo DNS se calentó agua destilada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se disolvió 5 g de ácido dinitrosalicílico, después se añadió 50 mL de una solución NaOH 4M, posteriormente se agregó 150 g de Tartrato de Sodio y Potasio y se calentó hasta disolución completa de los sólidos. Se dejó enfriar la solución y se aforó a 500 ml. Para el análisis, se colocaron 3 ml de extracto de azúcares y 1 ml de reactivo DNS en un tubo, en seguida se calentó a baño maría en ebullición por 5 min. Pasado el tiempo se colocaron los tubos en hielo brevemente, se dejaron atemperar en agua a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. En cada set de análisis se incluyó como blanco una reacción con 3 ml de agua destilada en lugar del extracto de azúcares. Las concentraciones se calcularon con la ecuación de la recta obtenida con una curva de calibración de glucosa.

7.3.8. Determinación de amino nitrógeno libre

La determinación del amino nitrógeno libre (ANL) se llevó a cabo según el método 945.30 L de la AOAC. Las muestras molidas se suspendieron en agua, se agitaron con vortex por 10 min y se dejaron reposar 5 min, después se separaron los sobrenadantes y se realizaron diluciones adecuadas. Se tomó 2 ml de la dilución en un tubo de ensayo y se adicionó 1 ml de reactivo ninhidrina (10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6 g KH_2PO_4 , 0.5 g 1,2,3-

indantriona·H₂O, 0.3 g fructosa aforados a 100 ml). Se agitó con vortex y se calentó en ebullición durante 16 min. Pasado el tiempo, se pasaron los tubos a un baño de agua a 25 °C y se dejó atemperar. Después se agregó 5 ml de solución de dilución (2g KIO₃, 400 ml etanol y 600 ml agua destilada) y se midió la absorbancia a 570 nm. En cada set de análisis se incluyó un blanco que consistió de agua destilada en lugar de la muestra y adicionalmente una solución de glicina (0.0107 mg/ml) con los cuales se siguió el mismo procedimiento. Para calcular la concentración de amino nitrógeno libre se usó la siguiente formula:

$$ANL = \frac{(absorbancia\ de\ la\ muestra)(2)(100)}{(absorbancia\ de\ la\ solucion\ de\ glicina)}$$

7.3.9. Actividad enzimática

Para la extracción de las enzimas, el maíz molido se pasó por un tamiz malla No. 30, se pesó un gramo y se agregó a 10 ml de buffer de acetato (acetato de sodio 100 mM, 1 mg/ml BSA, pH 4.5) y se dejó en reposo a 25 °C por 15 min. Posteriormente, se agito con vortex a 3,000 rpm por 10 min y en seguida se centrifugo a 1000 g por 10 min a 25 °C. Los extractos enzimáticos se almacenaron en alícuotas de 1 ml a -20 °C hasta su uso.

7.3.9.1. Actividad α -amilasa

La actividad de α -amilasa se cuantificó mediante un método modificado de digestión de almidón como lo describe Vega-Villasante y colaboradores (1993) con algunas modificaciones. La mezcla de ensayo contenía: 450 μ l de buffer tris-HCL (50 mM, pH 7.5) y 50 μ l de extracto enzimático. La mezcla se pre-incubó a 35 °C durante 5 min, posteriormente se agregó 500 μ l de almidón al 1.0% (disuelto en buffer tris-HCL) y se incubó por 10 min a 35 °C. La hidrólisis del almidón se determinó de la siguiente manera: inmediatamente después de la incubación, se añadieron 200 μ l de Na₂CO₃ (2 N) y 1.5 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) a la mezcla de reacción y se hirvieron durante 15 minutos. Este volumen se ajustó a 5 ml con agua destilada y la solución se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Los blancos se prepararon usando un extracto crudo previamente inactivado por ebullición durante 10 minutos. Se preparó un control adicional reemplazando el extracto crudo con buffer tris-HCL. Se usaron

soluciones estándar de glucosa como referencia para cuantificar la hidrólisis del almidón. La actividad de la amilasa se expresó como el número de unidades de amilasa por g de maíz, donde 1 unidad de α -amilasa es equivalente a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ g de glucosa / min a 35 °C.

7.4. Resultados

7.4.1. Caracterización del grano

En la Tabla 11 se encuentran los resultados de las pruebas biofísicas del grano. De acuerdo a su peso hectolitrico y su índice de flotación, el grano se clasifica como duro. Respecto al tamaño, de acuerdo a sus dimensiones el grano se considera grande, sin embargo, debido a su peso de 1000 granos se clasifica como pequeño.

Tabla 11. Caracterización biofísica de los granos de maíz.

Parámetro	Resultado	Interpretación:
Peso hectolítrico (g/L)	795.3 \pm 6.3	Duro
Peso de 1000 granos (g)	263.8 \pm 14.3	Pequeño
Índice de flotación (%)	36.7 \pm 1.5	Duro
Dimensiones (mm)	9.9 \pm 1.1 largo 8.1 \pm 0.7 ancho 4.1 \pm 0.8 grosor	Grande

7.4.2. Absorción de agua

En la Figura 9 se observa la absorción de agua durante el remojo de maíz a 25 °C. La absorción de agua a 25 °C fue notablemente lenta, extrapolando con la ecuación de la recta se calculó que tomaría 41 h que el grano llegara a una humedad del 38 % y 62 h alcanzar el 40 %. Inicialmente se buscaba alcanzar una humedad del 38-40%, sin embargo, se encontró que 30% era lo mínimo que necesitaban los granos de maíz para lograr germinar. Debido al prolongado tiempo necesario para la absorción de agua a 25 °C se decidió probar con temperaturas más altas, adicionalmente, se decidió burbujear aire con una bomba para pecera durante el remojo para evitar que la falta de oxígeno redujera la actividad metabólica y limitara la germinación.

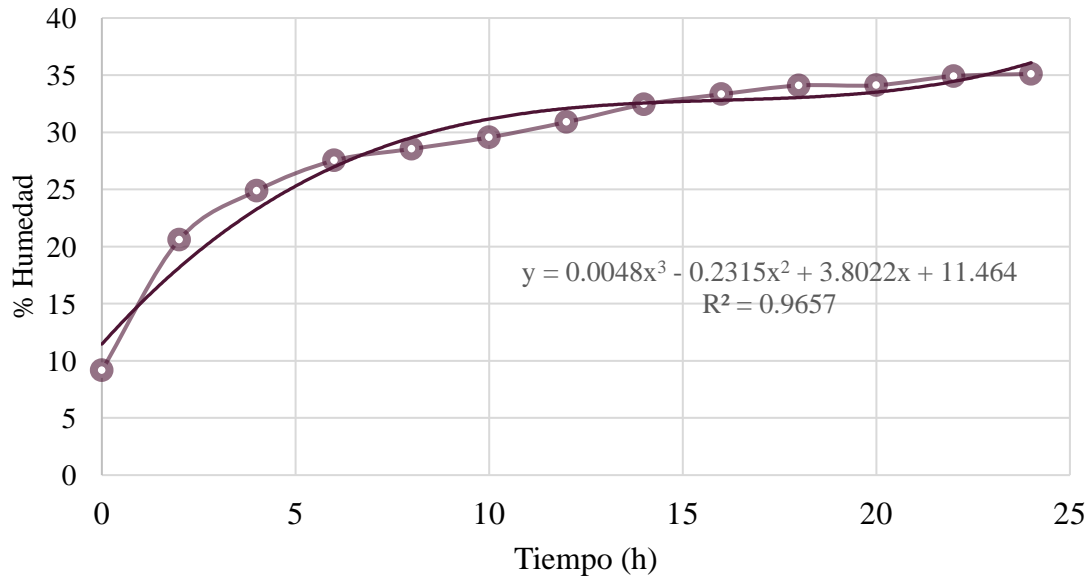


Figura 9. Cinética de absorción de humedad del grano de maíz durante la inmersión en agua a 25 °C.

En la Figura 10 se observa la absorción de agua durante el remojo de maíz con burbujeo de aire a diferentes temperaturas. Con temperaturas más elevadas se observó una disminución en el tiempo necesario para llegar a 30 % de humedad. El remojo a 30 °C consiguió la absorción más rápida de humedad, se encontró que el tiempo para alcanzar una humedad de 30% fue de 15, 8, 11y 10.5 h a 25, 30, 40 y 60 °C respectivamente, en tanto que los tiempos necesarios para alcanzar 35% de humedad fueron de 35, 19, 14.5 y 14.5 h a 25, 30, 40 y 60 °C respectivamente. También se notó que a 30 °C había un aumento acelerado de la humedad durante las primeras 12h donde se alcanzaba aproximadamente 33% de humedad y posteriormente la humedad no volvía a aumentar si no hasta las 30 h. Debido a estos resultados, para las pruebas de germinación se puso en remojo el maíz a 30 °C durante 12 h.

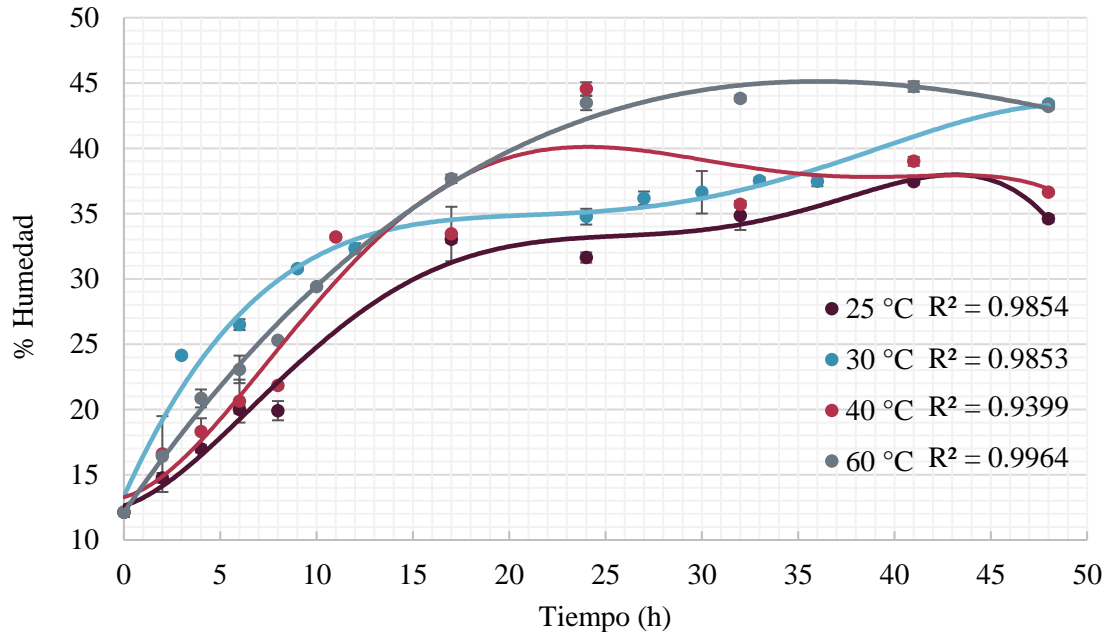


Figura 10. Cinética de absorción de humedad del grano de maíz durante la inmersión en agua a diferentes temperaturas.

7.4.3. Reducción de carga microbiana en los germinados

Estas pruebas se realizaron tras hacer la cinética de absorción de agua a 25 °C, se decidió hacerlas al encontrar altas cargas microbianas tras el remojo a 41 y 62 h y alta contaminación en los germinados que podía causar degradación. En la Figura 11 se encuentran los resultados de esta prueba, cabe señalar que no se incluyen en la gráfica los resultados el tratamiento con cloro 1% durante min debido a que los contenidos microbianos resultaron incontables. El sanitizado fue efectivo para reducir la carga microbiana tras la desinfección del grano, sin embargo, durante el remojo se apreció nuevamente crecimiento microbiano. Debido a esto se decidió probar temperaturas más altas durante el remojo para reducir el tiempo necesario de este paso. El cloro no mostró diferencias importantes entre concentraciones o tiempos de contacto, fue altamente efectivo para reducir el contenido de hongos y levaduras, por otro lado, no fue eficiente para mantener bajo el contenido de coliformes y mesófilos aerobios tras las 41 y 62 h de remojo. Por su parte, el ácido peracético fue más efectivo a 533 ppm que a 80 ppm. En general, el tratamiento de sanitizado más efectivo fue ácido peracético a 533 ppm durante 3 min.

Una vez definidas las condiciones de remojo en 12 h a 30 °C con burbujeo de aire, se encontró que las cargas microbianas habían aumentado nuevamente debido al burbujeo de aire, muy probablemente debido al polvo que arrastraba consigo la corriente de aire. Debido a esto se probó con diferentes filtros (fibra de vidrio en dos presentaciones, algodón y/o papel) para reducir la contaminación debida al burbujeo, las pruebas se fueron definiendo conforme se obtenían resultados y el material (caso de la fibra de vidrio tipo lana) por lo que no se probaron todas las combinaciones posibles, si no las que parecían mas factibles conforme se desarrollaban las pruebas. Adicionalmente, tras algunas pruebas de filtrado se decidió probar un método de desinfección combinado de cloro y ácido peracético a las concentraciones y tiempos más efectivos encontrados en las pruebas anteriores, estos fueron: cloro 2% durante 5 min y ácido peracético 533 ppm durante 3 min. Los resultados de estas pruebas se encuentran en la Tabla 12. El método de filtrado más efectivo fue una combinación de algodón con filtro de papel, en cuanto al método de desinfección se encontró que la combinación de cloro y ácido peracético fue más efectivo que solo el ácido peracético, así que las pruebas de germinación que se describen en delante se realizaron con el remojo bajo estas condiciones.

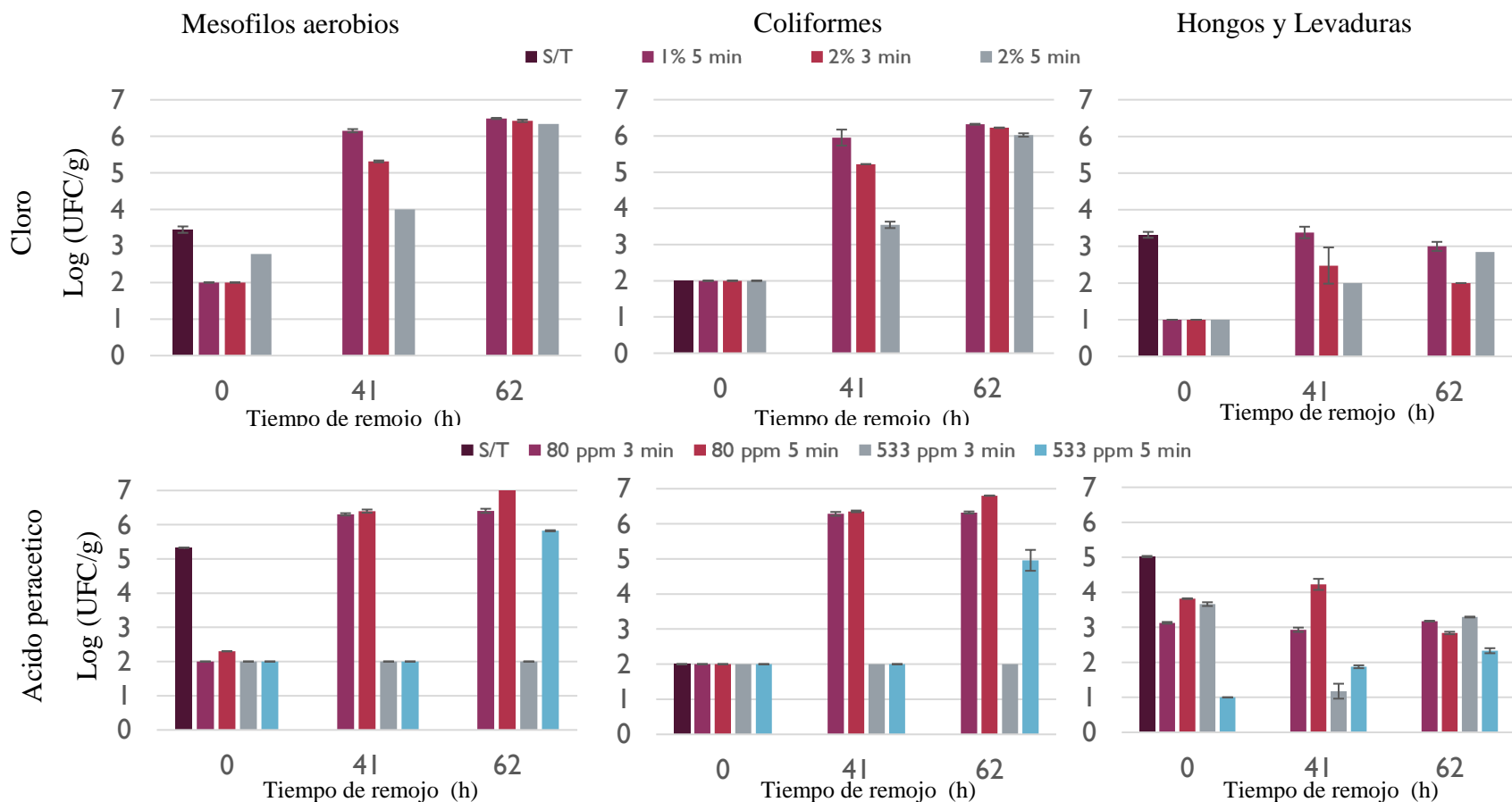


Figura 11. Carga microbiana de maíz sin ningún tratamiento (S/T), maíz sanitizado con cloro (a) o ácido peracético (b) a diferentes concentraciones y tiempos de contacto; y maíz sanitizado del mismo modo y puesto en remojo por 41 y 62 h.

Tabla 12. Carga microbiana al inicio y al final del remojo de maíz a 30 °C con diferentes condiciones de filtrado del aire y desinfección del grano.

Filtro(s)	Desinfección	Microorganismo	UFC/g Inicial	UFC/g Final
Fibra de vidrio tipo cordón	Ácido peracético 533 ppm/3 min	Coliformes	<100	100
		Mesófilos aerobios	<100	1,500
		Bacterias lácticas	<100	69,000
		Hongos y levaduras	600	129,500
Fibra de vidrio tipo cordón + papel filtro	Ácido peracético 533 ppm/3 min	Coliformes	<100	<100
		Mesófilos aerobios	<100	217,500
		Bacterias lácticas	<100	<100
		Hongos y levaduras	2,120	294,000
Fibra de vidrio tipo lana + papel filtro	Ácido peracético 533 ppm/3 min. Cloro 2% /5 min	Coliformes	<10	<10
		Mesófilos aerobios	6,500	83,500
		Bacterias lácticas	3,500	36,300
		Hongos y levaduras	660	112,500
	Ácido peracético 533 ppm/3 min	Coliformes	<10	<10
		Mesófilos aerobios	Incontable	24,000
		Bacterias lácticas	4,150	6,200
		Hongos y levaduras	66,000	355,000
Algodón + papel filtro	Ácido peracético 533 ppm/3 min	Coliformes	<100	100
		Mesófilos aerobios	<100	15,000
		Bacterias lácticas	<100	<100
		Hongos y levaduras	4,600	289,500
	Ácido peracético 533 ppm/3 min Cloro 2% /5 min	Coliformes	<10	<10
		Mesófilos aerobios	<100	26,450
		Bacterias lácticas	150	19,600
		Hongos y levaduras	<10	42,500

7.4.4. Cambios físicos y nutrimentales durante la germinación

En la Tabla 13 se presentan los resultados de % humedad, % granos germinados y tamaño de radícula de los granos durante los experimentos de germinación, estos parámetros fueron medidos para monitorear el correcto desarrollo de la germinación. La humedad aumenta en gran medida de las 0 a las 24 h debido a la etapa de remojo, posteriormente permanece estable con el tiempo. Las radículas emergen entre las 24 y 48 h, continúan creciendo con el tiempo y finalmente se aprecia una elongación más pronunciada de las 96 a las 120 h.

Tabla 13. Desarrollo de los granos de maíz durante la germinación.

Tiempo (h)	% Granos germinados	Tamaño de radícula (mm)	% Humedad
0	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	19.1 ± 0.4 ^b
24	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	31.8 ± 3.7 ^a
48	84.9 ± 9.7 ^c	8.3 ± 1.3 ^c	30.4 ± 2.4 ^a
72	90.1 ± 1.8 ^{bc}	15.3 ± 1.9 ^{bc}	31.9 ± 0.9 ^a
96	92.5 ± 2.2 ^b	19.8 ± 5.5 ^b	30.4 ± 1.1 ^a
120	95.7 ± 4.1 ^a	28.7 ± 4.0 ^a	30.1 ± 0.5 ^a

*Medias en la misma columna que no comparten letra son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

Tabla 14. Contenido nutricional del maíz a diferente tiempo de germinación (bs).

Tiempo (días)	% Grasa	% Fibra cruda	% Proteína	% Ceniza	% Carbohidratos disponibles
0	3.57 ± 0.50 ^{a,b}	1.95 ± 0.18 ^a	6.32 ± 0.80 ^a	0.89 ± 0.28 ^c	87,11 ± 0,35 ^{a,b,c}
24	3.90 ± 0.52 ^a	2.08 ± 0.44 ^a	6.50 ± 0.52 ^a	1.10 ± 0.12 ^c	85,89 ± 0,77 ^c
48	2.77 ± 0.18 ^{b,c}	1.93 ± 0.39 ^a	6.63 ± 0.45 ^a	1.53 ± 0.14 ^{a,b}	87,11 ± 0,41 ^{a,b,c}
72	2.74 ± 0.37 ^{b,c}	2.14 ± 0.85 ^a	6.89 ± 0.46 ^a	1.85 ± 0.47 ^a	86,41 ± 0,98 ^{b,c}
96	2.49 ± 0.48 ^{b,c}	2.42 ± 0.13 ^a	6.54 ± 0.54 ^a	1.12 ± 0.90 ^{b,c}	87,50 ± 0,41 ^{a,b}
120	1.97 ± 0.22 ^c	2.30 ± 0.17 ^a	6.68 ± 0.57 ^a	0.79 ± 0.56 ^{b,c}	88,06 ± 0,53 ^a

*Medias en la misma columna que no comparten letra son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

El contenido nutrimental durante la germinación se encuentra en la Tabla 14, los resultados se expresan en base seca para evitar el efecto de dilución debido a la ganancia de humedad. El contenido de fibra y proteína no varía con el tiempo, los carbohidratos y ceniza varían sin una tendencia respecto al tiempo, mostrando tanto aumentos como disminuciones. El contenido de lípidos disminuye del día 1 al 2, otro cambio significativo se da al día 5 respecto al contenido de lípidos original.

La Figura 12 muestra el contenido de azúcares reductores y nitrógeno amino libre durante la germinación del maíz. El contenido de azúcares reductores aumenta durante las primeras 48 h y posteriormente no hay cambios significativos. Por otro lado, el contenido de nitrógeno amino libre aumenta durante las primeras 24 h, luego vuelve a aumentar entre las 48 y 96 h.

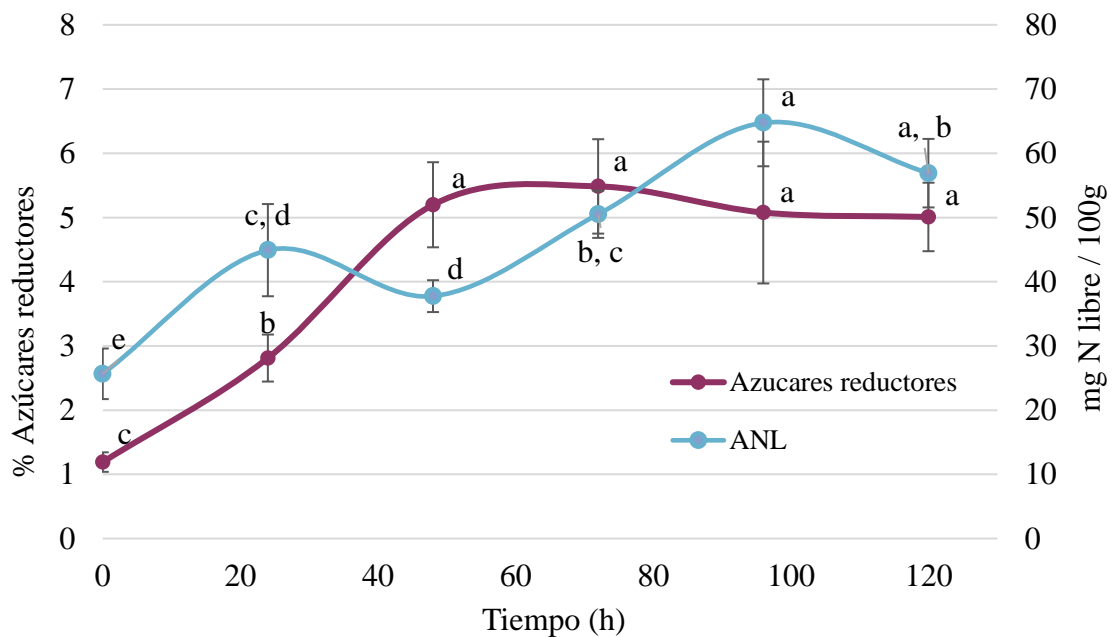


Figura 12. Cambios en el contenido de azúcares reductores y nitrógeno amino libre durante la germinación de maíz (bs). Medias que no comparten letra entre diferentes tiempos son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

7.4.5. Cambios en la actividad enzimática durante la germinación

La actividad de la enzima α -amilasa respecto al tiempo de germinación se presenta en la Figura 13. Se aprecia inicialmente un incremento alcanzando su punto más alto a las 48h,

posteriormente la actividad disminuye a las 72 h y permanece estable durante el resto de la cinética.

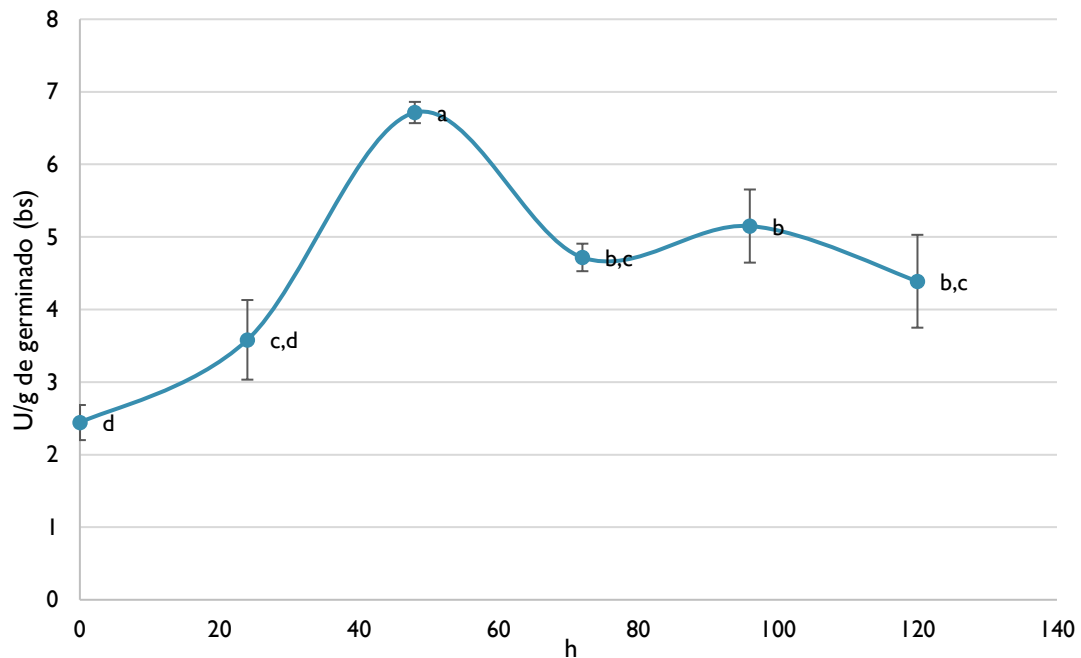


Figura 13. Cambios en el contenido de α -amilasa durante la germinación de maíz (bs). Medias que no comparten letra entre diferentes tiempos son significativamente diferentes (ANOVA-Tukey $p < 0.05$).

7.5. Discusión

En este capítulo se determinaron los cambios nutrimentales, químicos y enzimáticos que se dan en el maíz durante la germinación y se encontró el tiempo adecuado para obtener un germinado fermentable. También se definieron condiciones de sanitizado y remojo que reducen en gran medida la contaminación microbiana en los germinados.

7.5.1. Características biofísicas de los granos

Las propiedades físicas del grano se relacionan con su composición química y son la base para la selección de cereales de acuerdo a su funcionalidad y calidad. En el presente trabajo se determinaron algunas de las características relevantes para evaluar la calidad del maíz. El peso hectolítrico es un factor relacionado con la dureza, susceptibilidad a ruptura, rendimientos de molienda, velocidad de secado, condiciones generales del grano y resistencia al desarrollo de hongos (Palacios 2018). De acuerdo a esta prueba los granos se clasificaron como duros. La prueba de índice de flotación también indica que se cuenta

con granos duros, este parámetro está relacionado con la densidad y la dureza, usualmente los granos que flotan son suaves o tienen alta humedad (Figuroa et al. 2013). La dureza puede estar relacionada no solamente con las características físicas del grano, sino con las propiedades químicas, ambas características afectan la manera en la cual partículas se ensamblan en el grano, de este modo, que el grano sea duro nos da indicios del acomodo del almidón y la proteína: en el endospermo del maíz suave los gránulos de almidón son principalmente esféricos y débilmente empaquetados en una matriz, mientras que los de maíz duro son poligonales y altamente empaquetados (Narváez-González et al. 2007). Del mismo modo, los granos vítreos dan valores altos por que el contenido de proteína incrementa la densidad (Figuroa et al. 2013). El peso de 1000 granos relacionado con el tamaño, la densidad y la cantidad de granos dañados (Radosavljević 2000). Según esta prueba los granos se consideran pequeños, sin embargo, debido a sus dimensiones los granos se consideran grandes. Ya que la medición con vernier es una medida directa del tamaño, se dio prioridad a este criterio para definir la clasificación del tamaño, que el peso de 1000 granos indique un tamaño pequeño podría significar que hay una alta cantidad de granos dañados.

7.5.2. Efecto de la temperatura en la absorción de agua de los granos

El efecto de que el grano sea grande y duro se vio reflejado en el largo tiempo que necesita de remojo para alcanzar el 30% de humedad, ya que el tamaño de los granos correlaciona con la velocidad de absorción de agua y de cocción, entre más pequeño es, es más grande su capacidad de absorber agua debido a la gran área superficial disponible; por otra parte, la velocidad de penetración del agua también está relacionada con la dureza del grano (Maziya-Dixon 2000). En las cinéticas de absorción de agua se aprecia que las primeras horas hay un aumento acelerado de la humedad y luego es seguido por un aumento de forma más lenta en tanto se acerca asintóticamente al contenido de humedad de saturación tendiendo, también se ve que a mayor temperatura la velocidad de absorción aumenta, este comportamiento se ha encontrado en otras variedades de maíz y otros granos debido al incremento en la velocidad de difusión del agua (Holmberg et al. 1997; Tagawa et al. 2003; Verma et al., 1999). Se puede notar también que a mayor temperatura la humedad máxima alcanzada aumenta, este efecto ha sido previamente observado por Sharma et al.

(2018), que lo atribuyeron a la formación de grietas en la superficie de los granos que parecen permitir que más agua entre. La temperatura del agua de remojo y la concentración de almidón en el grano determinan el comportamiento del almidón, a temperatura ambiente los granos de almidón tienen muy poca absorción de agua, a medida que aumenta la temperatura también aumenta la absorción de agua por los gránulos de almidón hasta que colapsan, lo que conduce a la solubilización de la amilosa y la amilopectina para formar una solución coloidal (Ado et al. 2006; Agarry et al. 2014).

7.5.3. Reducción de la carga microbiana en los germinados.

Se encontraron altas cargas microbianas durante la germinación del maíz en las pruebas iniciales, entonces se decidió probar la desinfección de las semillas sumergiéndolas en una solución de cloro al 2% (20,000 ppm) debido a que la FDA recomienda este tratamiento para eliminar patógenos en germinados (FDA 1999), este método de desinfección fue altamente efectivo contra hongos y levaduras, sin embargo, no fue capaz para mantener baja la cantidad de mesófilos aerobios y coliformes durante la germinación. La evidencia científica al poner a prueba esta alta concentración de cloro ha mostrado resultados inconsistentes, diversos estudios reportan reducciones entre <1 y 8 unidades logarítmicas (Montville y Schaffner 2004). Estas diferencias podrían deberse a diferentes propiedades entre tipos de semillas, o incluso entre lotes de semillas (FAO/WHO 2008). Adicionalmente al cloro, se puso a prueba la eficacia del ácido peracético para desinfectar los granos, este químico es usado de manera industrial para desinfectar frutas y hortalizas. La concentración de 533 ppm de ácido peracético redujo en mayor medida que otros tratamientos el contenido de mesófilos aerobios y coliformes; el ácido peracético no fue tan efectivo como el cloro para reducir los hongos y levaduras tras la desinfección, sin embargo, mantuvo las concentraciones de estos microorganismos relativamente estables durante la germinación, mientras que la desinfección con cloro mostró aumentos importantes con el tiempo. Contrario a lo que se podría esperar, en el caso de ácido peracético a 533 ppm el remojo por 3 min fue más efectivo que el remojo por 5 min, otros autores han encontrado previamente resultados variables sobre el efecto del tiempo de remojo en la eficacia de la desinfección con diversos tratamientos, en algunos casos los

tiempos de remojo más largos mejoran la eficacia y en otros casos, por el contrario, la eficacia disminuye (Scouten y Beuchat 2002).

Se observó que algunos tratamientos reducían la carga microbiana tras la desinfección de los granos, sin embargo, durante la germinación las cuentas microbianas volvían a elevarse. En un estudio previo se reporta la recuperación de patógenos durante la germinación de las semillas tratadas con diversos métodos, los germinados alcanzaron niveles de 10^7 a 10^8 UFC/g, lo que indica la importancia de tener en cuenta las células lesionadas mediante el uso de medios selectivos y no selectivos (Lang et al. 2000). En el presente trabajo el tratamiento más efectivo consistió en una combinación de cloro al 2% con un tiempo de remojo de 5 min seguido de una segunda desinfección con ácido peracético 533 ppm con tiempo de remojo de 3 min. Al desinfectar las semillas de maíz con el tratamiento más efectivo se encontró un porcentaje de germinación del 95.7%, este valor se consideró aceptable tomando en cuenta que el porcentaje adecuado para el malteado en sorgo y cebada es del 90 y 96% respectivamente (Bofill Rodríguez et al. 2017), se comparó con estos dos granos al no encontrar un lineamiento específico para maíz.

7.5.4. Cambios nutrimentales en los germinados

Se aprecia una disminución en el contenido de lípidos y aumento en las cenizas de manera significativa ($p < 0.05$), este efecto ha sido observado previamente por múltiples autores en maíz, sorgo y arroz (Asiedu et al. 1993; Gernah et al. 2011; Hung et al. 2012), la reducción del contenido de lípidos se ha atribuido a su hidrólisis para producir la energía necesaria para llevar a cabo los cambios bioquímicos y fisicoquímicos durante la germinación (Hiran et al. 2016). El contenido de lípidos disminuye de la 24 a las 48 h, lo cual concuerda con el tiempo de la aparición de las radículas; el siguiente cambio significativo respecto al contenido de lípidos original se da entre las 96 y 120 h, tiempo que a su vez concuerda con el alargamiento más pronunciado de las radículas. Esto hace suponer que son los lípidos la fuente de energía que se está empleando para promover el crecimiento durante la germinación y concuerda con los reportes previamente mencionados respecto a su aprovechamiento como fuente de energía.

El contenido de proteína no se vio modificado por la germinación, en este sentido, existen discrepancias en los estudios anteriormente mencionados, ya que algunos autores han encontrado incrementos de este nutriente y otros no han visto cambios. Ongol y colaboradores (2013) reportan que, al germinar dos variedades de maíz, una de estas mostró un incremento en el contenido de proteína mientras que en la otra no hay cambios significativos. Ya que en este último estudio los granos fueron germinados de manera idéntica, el que el contenido de proteína aumente o no pareciera estar más ligado al tipo de variedad que a las condiciones de germinación.

Los carbohidratos mostraron algunos cambios sin presentar una tendencia respecto al tiempo de germinación, por su parte, el contenido de fibra se mantuvo sin cambios. Del mismo modo que en el caso de la proteína, hay en la literatura resultados discrepantes y otros similares a los aquí encontrados sobre los cambios en el contenido de fibra y carbohidratos, sin embargo, en la mayor parte de los reportes se aprecian disminuciones en ambos nutrientes debido a la actividad de enzimas hidrolíticas que los vuelven moléculas más pequeñas (Gernah et al. 2011).

7.5.5. Cambios bioquímicos durante la germinación

En la industria cervecera se ha definido que el contenido de ANL mínimo para alcanzar un crecimiento satisfactorio de las levaduras durante la fermentación es de 130 mg ANL/L (Hill y Stewart 2019), entonces, conocer la concentración de ANL en los germinados será de utilidad para calcular la concentración de maíz germinado requerida para las fermentaciones posteriores. Se encontró que entre las 24 y 48 h se interrumpe el incremento del amino nitrógeno libre, es interesante que en ese mismo tiempo se da el aumento más pronunciado de la actividad de las α -amilasas, esto da indicios de que los aminoácidos libres se están empleando para producir enzimas en ese lapso de tiempo.

De manera congruente, el contenido de azúcares reductores aumenta a la par de la actividad de las enzimas amilasas durante las primeras 48 h de germinación, después de esto la actividad de las amilasas disminuye, en tanto que el contenido de azúcares permanece estable. Al respecto, Yu y colaboradores (1996) encontraron que los azúcares son moléculas señalizadoras que regulan la expresión los genes que codifican para las amilasas durante la germinación de los cereales. Anteriormente se había determinado que

los lípidos son la fuente de energía que se está usando para promover el crecimiento, así todo indica que, como los azúcares no se están gastando, se acumulan provocando la inhibición de la síntesis de las amilasas y como consecuencia se tiene el estancamiento en el contenido de azúcares. La máxima actividad de las amilasas durante la germinación ha sido reportada previamente a los 4 (Biazus et al. 2009), 6 (Habschied et al. 2014; Thevenot et al. 1992) y 13 días (Dziedzoave et al. 2010) para diferentes variedades de maíz, cabe mencionar que las condiciones de germinación tales como tiempo de remojo, temperatura y luz/obscuridad son variables entre las referencias.

A las 96 h de germinación el ANL muestra un valor más alto; desde el punto de vista de los azúcares, después de las 48 h se mantiene constante el contenido, así que cualquier tiempo después de esas horas es adecuado; las α -amilasas muestran su mayor actividad a las 48h, sin embargo, en ese tiempo el contenido de ANL es bajo y por tanto desfavorable, considerando el segundo valor más alto de α -amilasas tenemos las 96 h.

7.6. Conclusiones

En el presente trabajo el tratamiento más efectivo consistió en una combinación de cloro al 2% con un tiempo de remojo de 5 min seguido de una segunda desinfección con ácido peracético 533 ppm con tiempo de remojo de 3 min, estas condiciones permitieron obtener germinados inocuos y un alto porcentaje de germinación (95.7%). El contenido de lípidos disminuye durante la germinación, siendo la fuente de energía que se emplea para promover el crecimiento durante la germinación. Los carbohidratos mostraron algunos cambios sin presentar una tendencia respecto al tiempo de germinación, por su parte, el contenido de fibra y de proteína se mantuvo sin cambios; en este sentido, hay en la literatura resultados discrepantes y otros similares, esto podría estar ligado al tipo de variedad de maíz utilizada. En general a las 96 h se cuenta con el mejor balance entre ANL, azúcares reductores y α -amilasas ya que en este tiempo el ANL muestra su valor más alto; desde el punto de vista de los azúcares, después de las 48h se mantiene constante el contenido, así que cualquier tiempo posterior es adecuado; las α -amilasas muestran su mayor actividad a las 48h, sin embargo, en ese tiempo el contenido de ANL es bajo y desfavorable para fermentar, así que se consideró el segundo valor más alto de α -amilasas (96 h).

8. CAPÍTULO 3. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MAÍZ CON UN MICROORGANISMO PROBIÓTICO

8.1. Resumen

Se realizaron fermentaciones con el fin de mejorar el contenido de proteína del maíz germinado y obtener una bebida probiótica. Se realizaron cinéticas de fermentación de suspensiones al 20% de maíz germinado con *Lactobacillus plantarum* V3 y *L. acidophilus* LA3 para seleccionar una bacteria para la siguiente fase, posteriormente mediante metodología de superficie de respuesta se optimizaron el tiempo de fermentación y el pH inicial para maximizar el contenido de proteína, probióticos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Ambas bacterias tuvieron un comportamiento similar en cuanto a crecimiento, producción de AGCC y aumentos de proteína. Se encontró que las condiciones óptimas para proteína, probióticos y AGCC fueron de 56.2 h pH 7.0, 47.2 h pH 4.5 y 72.0 h pH 4.6 respectivamente, también se calcularon las condiciones óptimas para diferentes combinaciones de los factores y se eligió la de proteína y probióticos en combinación (46.9h, pH 7.0), debido a su alto valor de deseabilidad compuesta (0.903) y a la importancia de estos factores. Los valores obtenidos en la fermentación bajo condiciones óptimas fueron similares a las predicciones. Por medio de la optimización de la fermentación del maíz germinado se aumentó el contenido de proteína en un 30.5% (bs) y se obtuvo una bebida con una alta dosis de probióticos (8.9 Log), además se alcanzaron concentraciones de AGCC que podrían tener un efecto en la prevención de la diabetes y el control de peso.

8.2. Introducción

Los cereales proveen el 50% de la energía disponible en países occidentalizados y en países en desarrollo llegan a proveer dos tercios de la energía y proteína, de entre todos los cereales, maíz, arroz y trigo corresponden en conjunto al 60% de este aporte (MacEvilly 2003). Estos alimentos son fuentes de carbohidratos, fibra y calorías, sin embargo, su contenido de proteína generalmente es bajo y la calidad de esta proteína es pobre debido a su baja digestibilidad (80-90%) y a la carencia de algunos aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (Serna-Saldivar 2016).

En algunos cereales se ha reportado que la fermentación puede mejorar la calidad nutrimental, este proceso puede aumentar el contenido de proteína o mejorar el perfil de aminoácidos ya sea por síntesis o por mejora de la disponibilidad (Nanson y Field 1984; Nkhata et al. 2018; Kazanas y Fields 1981; Klose y Arendt 2012). Otra ventaja de la fermentación es que los alimentos y bebidas pueden ser vehículos para microorganismos probióticos y metabolitos benéficos producidos por estos, como los ácidos grasos de cadena corta; estos compuestos y los probióticos están asociados a la salud intestinal, prevención de enfermedades metabólicas y a la modulación del sistema inmune (Canfora 2015; Gill 2017; Marco 2017). De esta manera, los alimentos y bebidas fermentados con probióticos podrían tener un efecto benéfico en el consumidor más allá de la nutrición y considerarse alimentos funcionales. Por tanto, la fermentación de los cereales puede ser una estrategia para mejorar su valor nutrimental, seguridad, y una oportunidad de obtener alimentos funcionales mediante la incorporación de bacterias probióticas.

La fermentación de bebidas a base de cereales es una práctica cultural y tradicional en África y América Latina, en donde este proceso ha sido aprovechado como un método de bajo costo para la conservación de los alimentos y en algunos casos para el enriquecimiento de la dieta (Nyanzi y Jooste 2012). Las bebidas tradicionales fermentadas cuentan con gran potencial como alimentos funcionales y se consideran fuentes prometedoras para encontrar nuevos microorganismos probióticos (Franz et al. 2014), sin embargo, su elaboración es aun llevada a cabo de manera familiar como un arte, lo que acarrea algunos problemas: falta de homogeneidad, inadecuados materiales e higiene y una percepción negativa por la población joven o de áreas urbanizadas (Achi y Ukwuru 2015). Por otra parte, hay una gran variación en la comunidad microbiana de las materias primas y los microorganismos clave para la fermentación suelen ser múltiples y estar complejamente relacionados, esto dificulta su reproducción (Lappe y Ulloa 1989; Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2010; Wachter 2000). Estandarizar procesos, optimizar condiciones de fermentación de los cereales, el uso de cultivos iniciadores puros y definir que cultivos emplear es clave para obtener alimentos y bebidas inocuos, reproducibles y de alta calidad sanitaria y nutrimental. El objetivo del presente capítulo fue optimizar las condiciones de fermentación del maíz germinado para aumentar el contenido de proteína y obtener una bebida funcional con probióticos.

8.3. Material y métodos

8.3.1. Procesado previo del maíz

Al menos un día previo a su uso, el maíz se pasó del congelador (-20 °C) a refrigeración (4 °C) y el día de prueba se dejó atemperar (25 °C) durante 30 min. Posteriormente el maíz se desinfectó y germinó de acuerdo a lo definido en el capítulo dos.

8.3.2. Elaboración de harina de maíz germinado

Se germinó el maíz como se definió en la sección 7 (capítulo 2), posteriormente el germinado se deshidrató a 54°C por 5 h en un horno de convección, que son las condiciones reportadas como óptimas para reducir la pérdida de actividad α -amilasa en germinados de maíz (Biazus et al. 2005). El germinado deshidratado se pulverizó en un molino de laboratorio (Pulvex S.A., México) acoplado con un tamiz de apertura de 2 mm, los diferentes lotes de germinado ya molido se mezclaron y homogenizaron para evitar variación en los resultados debida a la diferencia entre lotes. La harina de germinado se empacó en bolsas impermeables a la humedad que fueron cerradas al vacío para después ser almacenadas a -20 °C. El día de prueba se sanitizó la harina colocándola como una capa delgada (aproximadamente 0.3 cm) en charolas e irradiándola con luz UV por 15 min, posteriormente se agitó la harina y se esparció nuevamente como una capa para irradiar nuevamente por 15 min; este proceso se repitió 3 veces.

8.3.3. Preparación de suspensiones de maíz previo a su fermentación

Se prepararon suspensiones al 20% de sólidos de harina de maíz germinado en agua purificada previamente hervida y enfriada, se colocaron 60 ml de suspensión en frascos de cultivo de 250 ml con tapón de rosca y se llevaron a incubación a 40 °C por 1 h para permitir que actuaran las amilasas (Helland et al. 2002). Se determinó el contenido de azúcares reductores y la actividad de las amilasas antes y después de la incubación mediante los métodos descritos a detalle en el capítulo 2. Después, se calentaron los frascos a baño maría en ebullición por 1 h agitando ocasionalmente, esto para permitir la gelatinización del almidón, y finalmente se esterilizó en autoclave en condiciones estándar.

8.3.4. Selección del microorganismo

De manera inicial se seleccionó una bacteria entre las dos que mostraron las mejores características como probióticos en el capítulo 1, para esto, se realizaron fermentaciones con *Lactobacillus plantarum* V3 y *L. acidophilus* LA3 de manera individual a fin de evaluar su habilidad para crecer en el maíz germinado, su producción de AGCC y los cambios en el contenido de proteína. Se tomó 1 ml de un cultivo de 18 h crecido en MRS a 37 °C, se centrifugó (5000 rpm 5 min a 4 °C) y se lavó una vez con PBS, en seguida se preparó una dilución 1:4 en buffer de fosfatos para obtener un cultivo de trabajo a concentración de 3×10^5 UFC/ml aproximadamente. Se inocularon las suspensiones de harina de germinado de maíz con 1 ml de cultivo de trabajo y se incubaron a 37 °C, como control se incluyó una suspensión sin inocular. Se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h y se realizaron siembras de en MRS para evaluar el crecimiento de los probióticos, también se cuantificó el contenido de hongos y levaduras y mesófilos aerobios en las muestras. Se eligió para las siguientes pruebas la bacteria que mostró las mejores características considerando su capacidad de crecer en el germinado de maíz de producir AGCC y promover aumentos en el contenido de proteína.

8.3.5. Optimización del tiempo y pH inicial de la fermentación

Se realizaron pruebas para optimizar el crecimiento de los probióticos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y el contenido de proteína por medio de la fermentación. Los parámetros a optimizar fueron el pH inicial y el tiempo de fermentación, el rango de pH evaluado fue 4.5-7 considerando que se cuenta con una bacteria ácido láctica y el rango óptimo para la actividad de la α -amilasa; para la temperatura se probó el rango de 12 a 72 h, que es lo mínimo y lo máximo que habitualmente duran las fermentaciones tradicionales de maíz. El ajuste de pH se realizó al momento de preparar la suspensión de harina de germinado y no se llevaron a cabo ajustes posteriores. La temperatura se mantuvo a 37 °C en todas las pruebas, ya que esa es la temperatura optima para las bacterias ácido lácticas.

8.3.6. Validación del modelo y caracterización del fermento

Una vez encontradas las condiciones óptimas de tiempo y pH inicial, se realizó una fermentación con estas condiciones para obtener los valores reales de contenido de

bacterias probióticas, proteína y AGCC y así comparar con los datos teóricos de la predicción del modelo estadístico. Se realizó una caracterización del fermento analizando a) parámetros fisicoquímicos: pH, acidez, humedad y a_w ; b) carga microbiológica: contenido de bacterias probióticas, contaminación o crecimiento de mesófilos aerobios, coliformes y hongos y levaduras; y c) contenido nutrimental. La actividad de agua (a_w) se midió con el equipo Aqualab, el resto de los análisis se llevaron a cabo como se describió a detalle en capítulos anteriores.

8.3.7. Análisis estadístico

El estudio de optimización se llevó a cabo por medio de un diseño central compuesto con puntos centrales para evaluar el efecto combinado del tiempo y el pH inicial de las fermentaciones. Los rangos de los factores fueron los señalados en la sección 8.3.3 y los factores de respuesta fueron el contenido de proteína, AGCC y la concentración de probióticos, de modo que se obtuviera el contenido más alto posible de estos. Para el análisis de los datos se usó el software Minitab 17, se realizó un análisis de varianza, el cálculo de las condiciones óptimas para cada variable de respuesta y se obtuvieron los gráficos de superficie de respuesta y los modelos para cada factor de respuesta. Las diferencias significativas se definieron como $p < 0.05$.

8.4. Resultados

8.4.1. Fase de licuefacción

Previo a realizar las fermentaciones se llevó a cabo un paso de incubación a 40 °C con el fin de permitir la acción de las amilasas y obtener mayor cantidad de azúcares fermentables (licuefacción), en la Tabla 15 se aprecia el efecto de este paso en el contenido de azúcares reductores y la actividad de las enzimas α -amilasa. Se puede notar que la actividad de las amilasas fue mayor en la suspensión que en la harina y que el contenido de azúcares aumenta 1.4 veces tras la licuefacción.

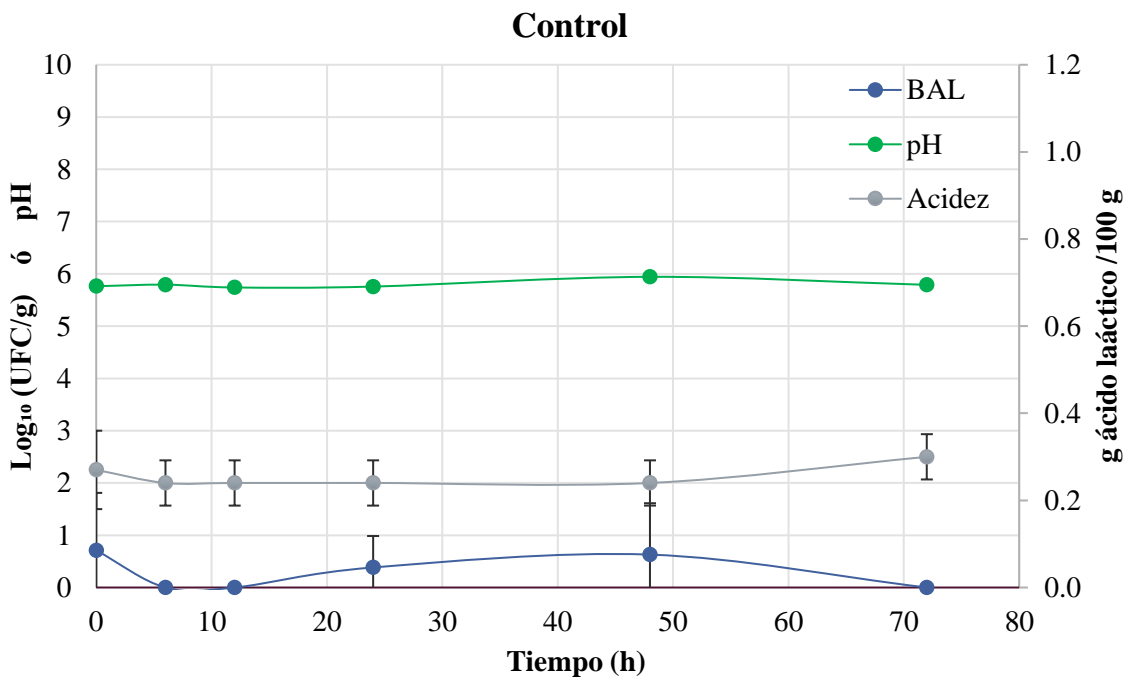
Tabla 15. Efecto de la licuefacción (40 °C/ 1h) de maíz germinado.

% Humedad	Actividad α -amilasa (U/g bs)	% Azúcares reductores (bs)	pH
-----------	---	-------------------------------	----

Harina de germinado	9.6± 0.2	21.9± 1.9 b	4.29± 0.29 b	--
Suspensión	82.9± 1.7	32.6± 6.4 a	4.26± 0.12 b	5.84± 0.04
Licuefacción	83.1± 1.0	23.7± 2.1 ab	6.05± 0.08 a	5.91± 0.01

8.4.2. Fermentación preliminar con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3

En la Figura 14 se muestran las cinéticas de fermentación del maíz germinado. Tanto *L. plantarum* V3 como *L. acidophilus* La3 fueron capaces de crecer en el maíz germinado en altas cantidades, y las fermentaciones con ambos microorganismos transcurren de manera muy similar: el contenido de probióticos muestra su valor más alto a las 12 h (9.32 y 8.95 log correspondientemente), después se mantiene constante hasta las 48 h y posteriormente disminuye aproximadamente 1 log. El pH disminuye drásticamente las primeras 24 h de fermentación tras lo cual se estabiliza, por su parte la acidez se mantiene en aumento desde las 6 h. El control, o suspensión sin inocular, se mantuvo sin cambios importantes a través del tiempo.



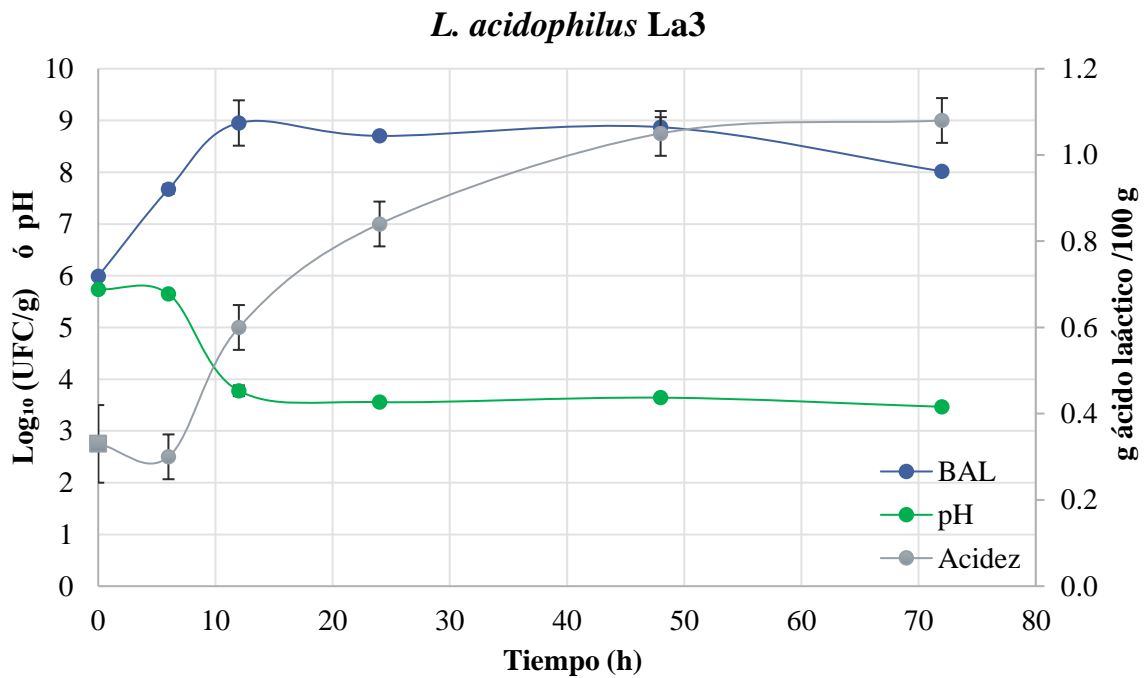
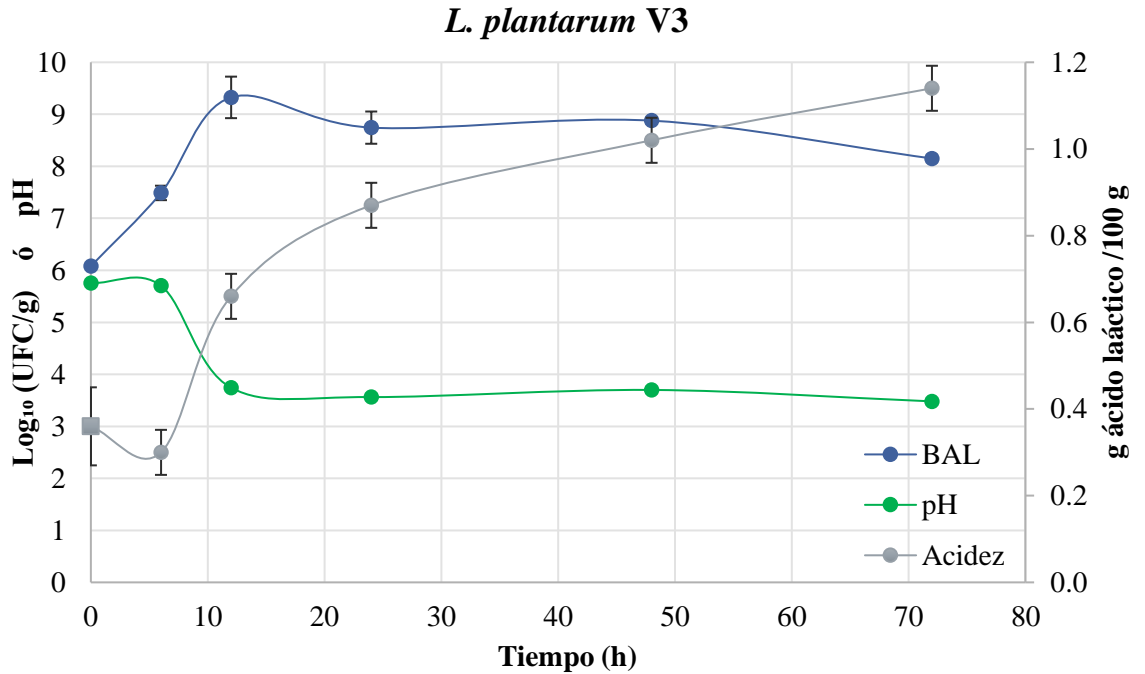


Figura 14. Cinéticas de fermentación de maíz germinado con *Lactobacillus plantarum* V3, *L. acidophilus* La3 o sin inoculo (control).

En la Figura 15 se encuentra el contenido de proteína a lo largo de las fermentaciones y en comparación el contenido en el maíz y la harina de germinado. A las 0 h de fermentación el contenido es el mismo en todos los tratamientos, después se observan algunos cambios que varían según la bacteria inoculada: en la fermentación con

Lactobacillus plantarum V3 a las 12 h se presenta una disminución, sin embargo, entre las 24 y 72 h se encontraron valores más altos que los iniciales; en la fermentación con *L. acidophilus* La3 a las 12, 48 y 72 h el contenido de proteína es más alto que el inicial, mostrando un valor máximo a las 72 h. tanto a las 48 como a las 72 h de fermentación los tratamientos con *Lactobacillus plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3 presentan valores significativamente mayores en comparación con el control. El control en cambio no muestra cambios significativos con el paso del tiempo.

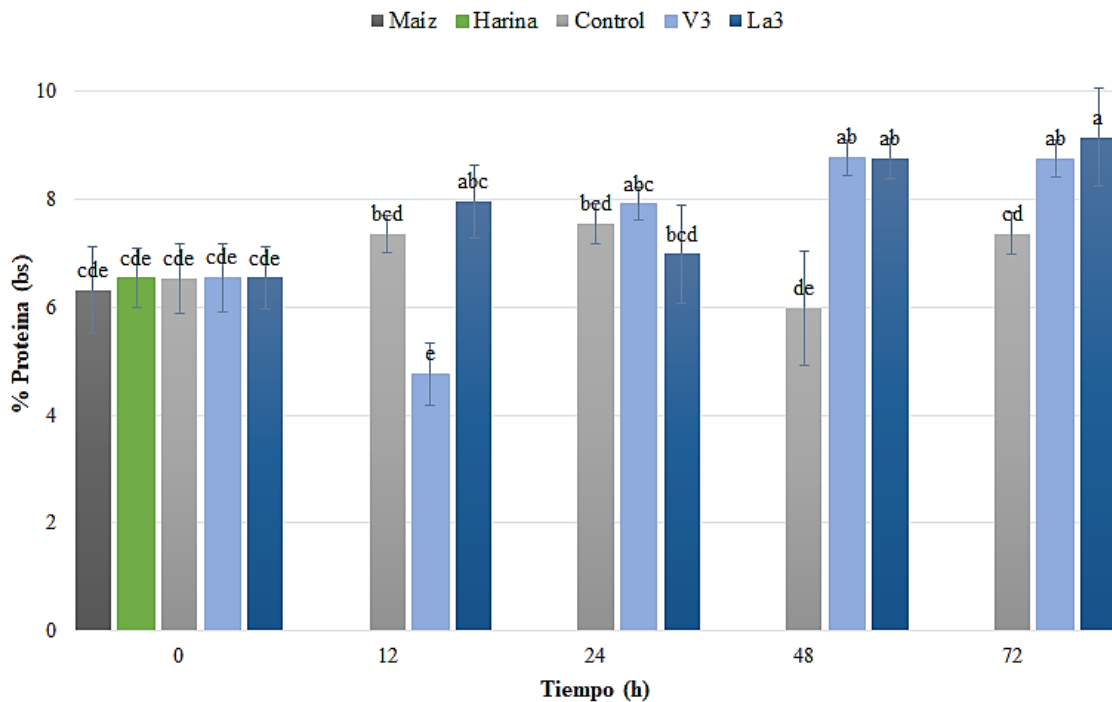


Figura 15. Contenido de proteína en maíz, harina de maíz germinado y maíz germinado y fermentado a diferentes tiempos sin inoculo (Control) con *L. plantarum* V3 (V3) o con *L. acidophilus* La3 (La3). Medias que no comparten letra son significativamente diferentes.

Se detectaron los ácidos acético, butírico, isovalerico, valerico, isocaproico, y caproico durante la fermentación de germinado de maíz por *L. plantarum* V3, *L. acidophilus* La3 o sin inocular (control). Los diferentes AGCC tuvieron comportamientos diferentes, como se aprecia en la Figura 16. El ácido acético mostró un aumento con el tiempo durante las primeras 24 h, los valores máximos se presentaron a las 24 y 48 h de fermentación con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3 y finalmente la concentración disminuye a las 72 h. El ácido butírico aumenta a las 24 y 48 h en la fermentación con *L. acidophilus* La3 y solo aumenta a las 24 h en la fermentación con *L. plantarum* V3, el control no presentó

cambios. El ácido isovalérico no presenta diferencias entre tratamientos y solo aumenta significativamente a las 24 en la fermentación con *L. acidophilus* La3. El ácido valérico no presentó una tendencia definida con la fermentación y presenta pocos cambios significativos. Los ácidos isocaproico y caproico cuentan con un comportamiento muy similar, las concentraciones más altas se aprecian a las 24 y 48 h en las fermentaciones con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3, sin embargo, solo en la fermentación con *L. acidophilus* La3 los contenidos son significativamente más altos que el control. En general, los valores más altos de AGCC se presentaron entre las 24 y 48 h y las fermentaciones con *L. plantarum* V3 o *L. acidophilus* La3 presentan comportamientos estadísticamente iguales.

8.4.3. Optimización de la fermentación

En la Tabla 16 se muestra el diseño central compuesto utilizado para optimizar las condiciones de fermentación, particularmente el pH inicial y el tiempo, que consistió en 28 tratamientos experimentales que se llevaron a cabo en orden aleatorio en cuatro bloques, incluyendo entre ellos dos repeticiones. En la Tabla 16 también se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos en cuanto al contenido de proteína, AGCC y probióticos, que son los factores por maximizar.

El análisis de varianza de los resultados se presenta en la Tabla 17. Como se observa, el pH inicial y el tiempo tuvieron un efecto significativo en el contenido de proteína ($p < 0.05$), en tanto que la interacción de estos factores no fue significativa ($p > 0.05$). El contenido de probióticos por su parte, no fue afectado por el pH inicial, el tiempo o la interacción de estos factores ($p > 0.05$), en cambio los efectos cuadráticos de estos factores resultaron significativos ($p < 0.05$). Finalmente, el contenido de AGCC totales es afectado significativamente por el pH inicial y el tiempo cuadrático. Se aprecia también que los modelos fueron significativos ($p < 0.05$). Los modelos de regresión donde se relaciona el contenido de proteína (a), de probióticos (b) o AGCC totales (c) con el pH inicial y el tiempo de fermentación se presentan a continuación:

$$a) y = 5,82 + 0,0365 \text{ Tiempo} + 0,43 \text{ pH} - 0,000187 \text{ Tiempo}*\text{Tiempo} - 0,0123 \text{ pH}*pH - 0,00221 \text{ Tiempo}*pH$$

$$b) y = 14,35 + 0,0539 \text{ Tiempo} - 2,292 \text{ pH} - 0,000490 \text{ Tiempo} * \text{Tiempo} + 0,2016 \text{ pH} * \text{pH} - 0,00176 \text{ Tiempo} * \text{pH}$$

$$c) y = -7,0 - 0,284 \text{ Tiempo} + 13,0 \text{ pH} + 0,00509 \text{ Tiempo} * \text{Tiempo} - 1,19 \text{ pH} * \text{pH} - 0,0284 \text{ Tiempo} * \text{pH}$$

Tabla 16. Diseño central compuesto con resultados para optimizar el contenido de probióticos, proteína y ácidos grasos de cadena corta en la fermentación de maíz germinado.

Tratamiento	PtTy pe	Bloque	Tiempo	pH	Probióticos Log (UFC/g)	% Proteína	AGCC (mM)
1	-1	4	42.0	7.00	8.96	8.70	10.49
2	0	4	42.0	5.75	8.73	8.39	14.99
3	0	4	42.0	5.75	8.78	8.39	16.82
4	-1	4	72.0	5.75	8.61	8.69	18.14
5	-1	4	12.0	5.75	7.77	8.40	21.76
6	-1	4	42.0	4.50	9.02	8.39	21.54
7	0	4	42.0	5.75	9.00	9.00	14.34
8	1	3	20.8	6.63	8.99	8.40	15.36
9	0	3	42.0	5.75	8.76	8.39	14.89
10	1	3	20.8	4.87	9.01	8.38	22.92
11	0	3	42.0	5.75	8.81	9.00	17.61
12	0	3	42.0	5.75	8.76	8.40	21.12
13	1	3	63.2	4.87	8.84	8.99	24.07
14	1	3	63.2	6.63	8.64	9.00	13.65
15	-1	2	42.0	4.50	9.01	8.41	16.40
16	-1	2	12.0	5.75	7.94	8.10	25.01
17	0	2	42.0	5.75	8.85	8.40	19.76
18	-1	2	42.0	7.00	8.95	8.98	13.59
19	-1	2	72.0	5.75	8.60	8.69	22.85
20	0	2	42.0	5.75	8.74	8.98	17.56
21	0	2	42.0	5.75	8.66	8.40	17.21
22	1	1	63.2	4.87	8.82	7.79	20.74
23	1	1	20.8	6.63	9.02	8.40	25.17
24	1	1	63.2	6.63	8.63	8.38	25.51
25	1	1	20.8	4.87	9.13	7.51	19.01
26	0	1	42.0	5.75	8.75	8.39	21.80
27	0	1	42.0	5.75	8.98	8.40	23.45
28	0	1	42.0	5.75	8.86	8.39	21.24

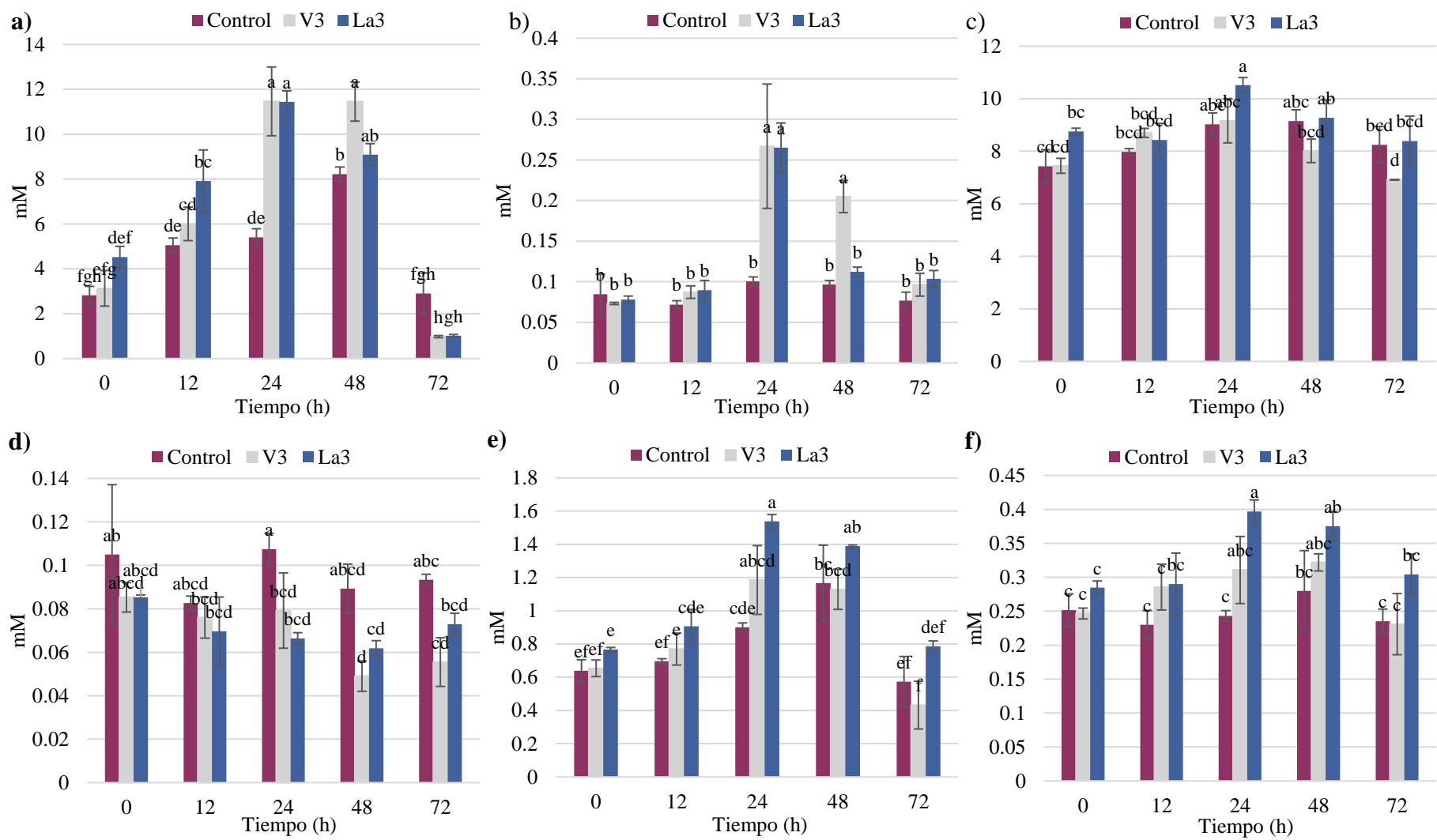


Figura 16. Cambio en la concentración de ácidos grasos de cadena corta: acético (a), butírico (b), isovalerico (c), valerico (d), isocaproico (e), y caproico (f) durante la fermentación de germinado de maíz por *L. plantarum* V3, *L. acidophilus* La3 o sin inocular (control).

Las gráficas de superficie de respuesta son la representación gráfica de los modelos de regresión. Como se puede ver en la Figura 17 el contenido de probióticos es mayor en las horas intermedias de fermentación, aumentando en un inicio y posteriormente disminuyendo; de manera contraria, el contenido de probióticos fue mayor en los valores de pH inicial de los extremos. Por otra parte, el contenido de proteína en las fermentaciones tiende a aumentar en los niveles más altos tanto de pH como de tiempo. En la Figura 18 se muestran las gráficas de superficie de respuesta para los AGCC individuales y para los AGCC totales. Los AGCC totales se refiere a la suma del contenido de los AGCC que se cuantificaron: el ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocapróico y caprónico; cabe señalar que fue la primera ocasión en que se encontró ácido propiónico en este estudio. Se puede notar que los AGCC disminuyen en tiempos cortos de fermentación y posteriormente aumentan, respecto al pH se puede ver que los valores cercanos a 4.5 y a 7 son desfavorables en tanto que los valores intermedios permiten un mayor contenido. Sin embargo, cada uno de los AGCC individuales tuvo su propio comportamiento.

En la Figura 19 se presenta un resumen de las condiciones óptimas para maximizar por separado el contenido de proteína, probióticos y AGCC totales. Las condiciones que permiten el contenido más alto de probióticos son fermentando 47.2 h con un pH inicial de 4.50, por su parte, las condiciones para maximizar el contenido de proteína fueron 56.2 h con pH inicial de 7.00. En cuanto a los AGCC totales, las condiciones más favorables fueron 72 h de fermentación con un pH inicial de 4.6. La deseabilidad (d), es decir, que tan eficientemente se optimiza las condiciones, en todos los casos se mantuvo arriba de 0.85 e incluso alcanzó el valor de 1.0000 (el más alto posible) para los probióticos de manera individual, de modo que se puede considerar que la optimización se realizó eficazmente.

Por otra parte, se obtuvieron predicciones de las condiciones para lograr resultados favorables para las tres respuestas como un todo, estas condiciones se presentan en la Figura 20. La configuración encontrada fue de pH inicial de 4.5 y 72 h de fermentación, sin embargo, la deseabilidad compuesta (D) fue de 0.7733, mucho más baja que la deseabilidad de los factores optimizados de manera individual. Adicionalmente, se calcularon las condiciones compuestas para proteína y probióticos; y para proteína y AGCC, estos resultados se aprecian en la Figura 21. La mejor combinación de condiciones para la combinación de proteína y AGCC fue de pH 5.31 y 72 h, con una deseabilidad de 0.7784. Para obtener el mayor

contenido compuesto de proteína y probióticos la fermentación se debe llevar a cabo por 45.94 h con un pH inicial de 7.00, con una deseabilidad de 0.9027. Para las siguientes fermentaciones se usaron las condiciones encontradas como óptimas para la combinación de proteína y probióticos.

Tabla 17. Análisis de Varianza del diseño central compuesto para optimizar el contenido de proteína, probióticos y ácidos grasos de cadena corta totales en la fermentación de maíz germinado.

Fuente	GL*	Proteína				Probióticos				Ácidos grasos de cadena corta totales			
		Adj SS ⁺	Adj MS [*]	F-Value	P-Value	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modelo	8	1.9800	0.2475	3.37	0.014	1.4723	0.1840	3.76	0.008	259.43	32.43	3.34	0.015
Bloques	3	0.9232	0.3077	4.19	0.02	0.2162	0.0720	1.47	0.253	114.33	38.11	3.92	0.025
Linear	2	0.9382	0.4693	6.38	0.008	0.0784	0.0392	0.8	0.463	47.18	23.59	2.43	0.115
Tiempo	1	0.4680	0.4680	6.37	0.021	0.0499	0.0499	1.02	0.325	2.78	2.788	0.29	0.598
pH	1	0.4701	0.4701	6.4	0.02	0.0284	0.0284	0.58	0.455	44.39	44.39	4.57	0.046
Cuadrados	2	0.1047	0.0523	0.71	0.503	1.1689	0.5844	11.95	0	95.65	47.82	4.92	0.019
Tiempo*Tiempo	1	0.1046	0.1046	1.42	0.247	0.7168	0.7168	14.66	0.001	77.56	77.56	7.98	0.011
pH*pH	1	0.0013	0.0013	0.02	0.893	0.3663	0.3663	7.49	0.013	12.69	12.69	1.31	0.267
Interacción	1	0.0137	0.0137	0.19	0.67	0.0087	0.0087	0.18	0.678				
2-Vias										2.266	2.26	0.23	0.635
Tiempo*pH	1	0.0137	0.0137	0.19	0.67	0.0087	0.0087	0.18	0.678	2.266	2.26	0.23	0.635
Error	19	1.3963	0.0734			0.9293	0.0489			184.68	9.72		
Falta de ajuste	11	0.6859	0.0623	0.7	0.713	0.8427	0.0766	7.08	0.005	155.42	14.13	3.86	0.033
Error puro	8	0.7103	0.0887			0.0865	0.0108			29.25	3.65		
Total	27	3.3763				2.4016				444.12			

*GL: grados de libertad; +Adj SS: suma de cuadrados ajustada; *Adj MS: media de cuadrados ajustada.

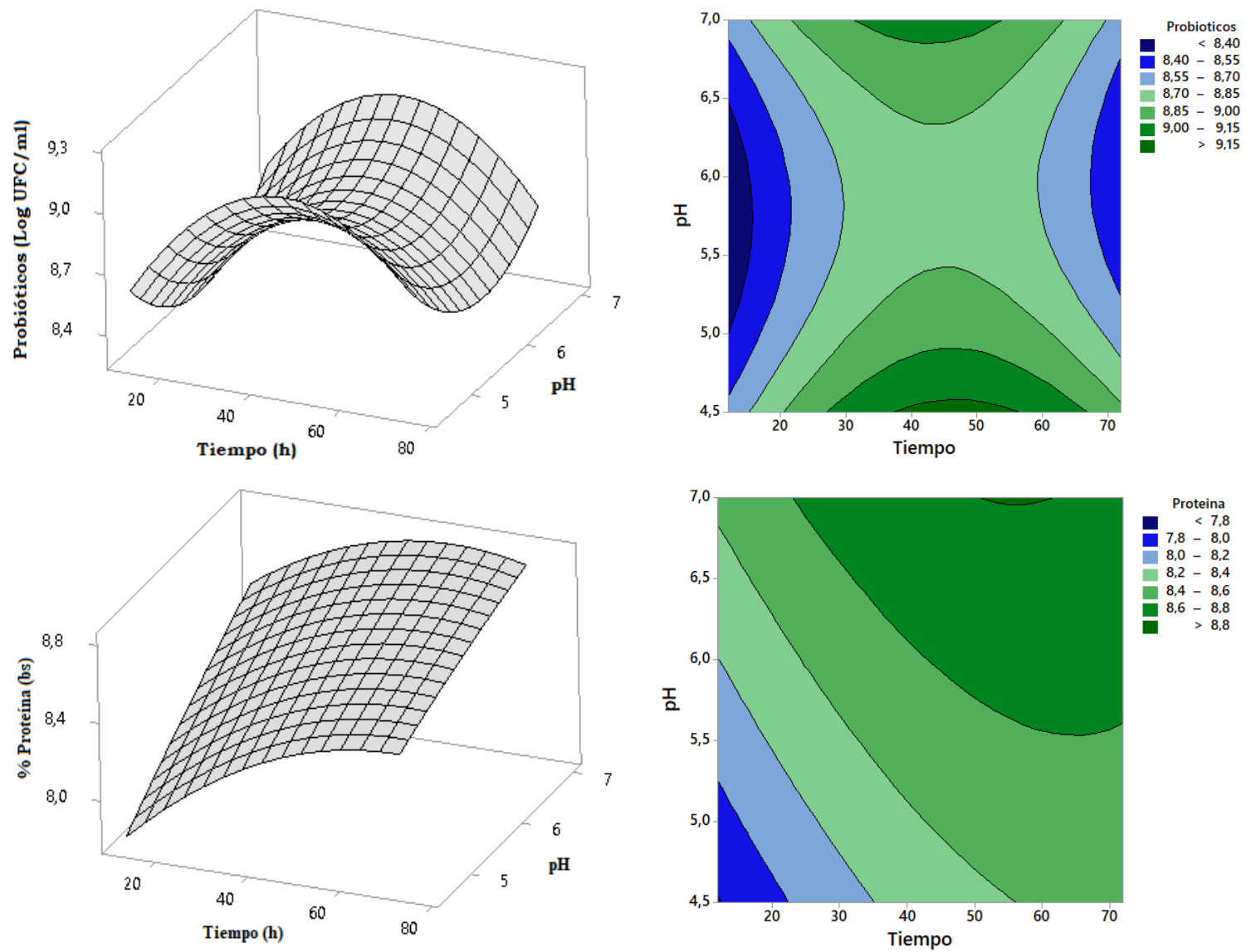


Figura 17. Superficies de respuesta y graficas de contornos mostrando los efectos del pH inicial y tiempo de fermentación de maíz germinado en el contenido de probióticos y proteína.

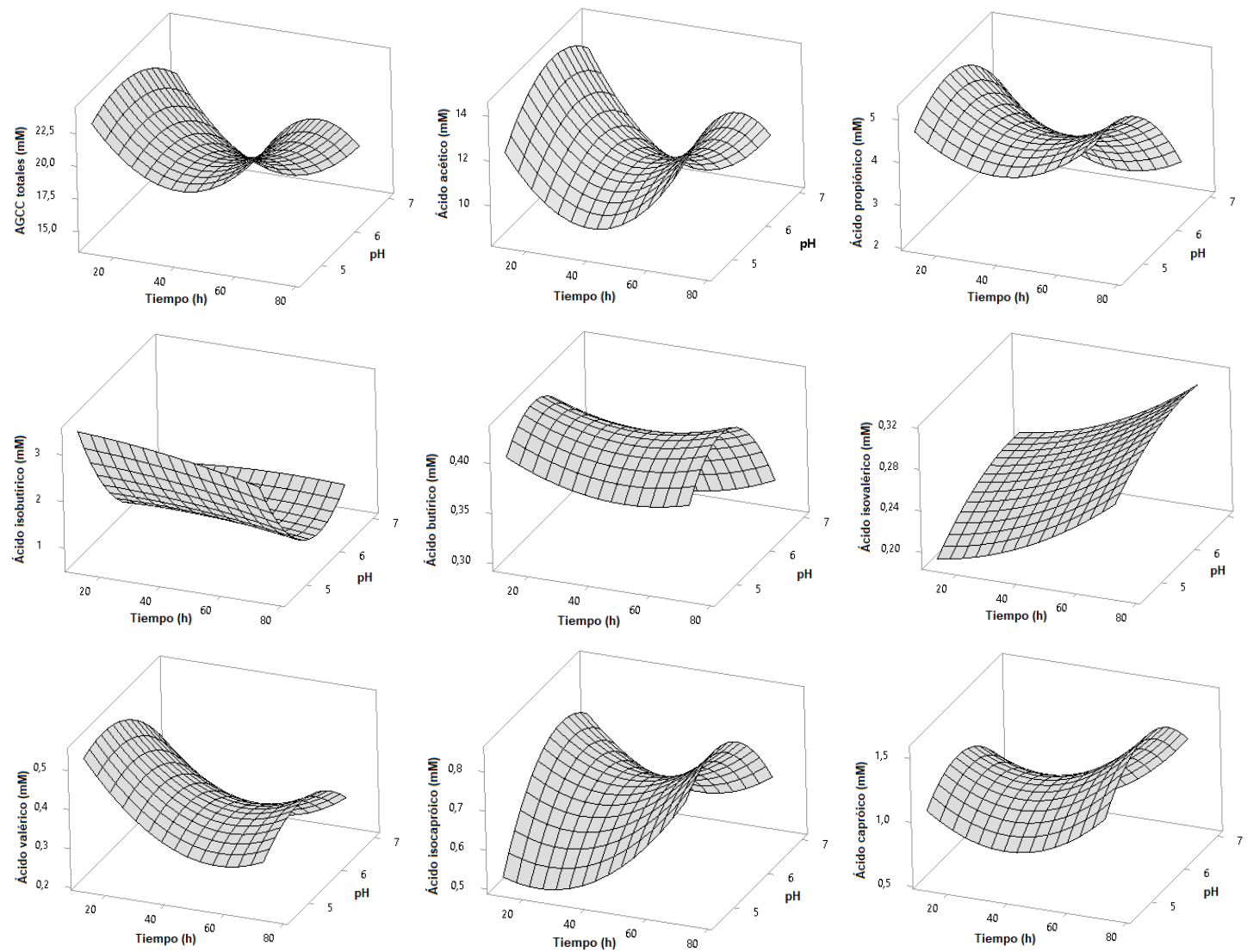


Figura 18. Superficies de respuesta mostrando los efectos del pH inicial y tiempo de fermentación de maíz germinado en el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales y en los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico y caproico.

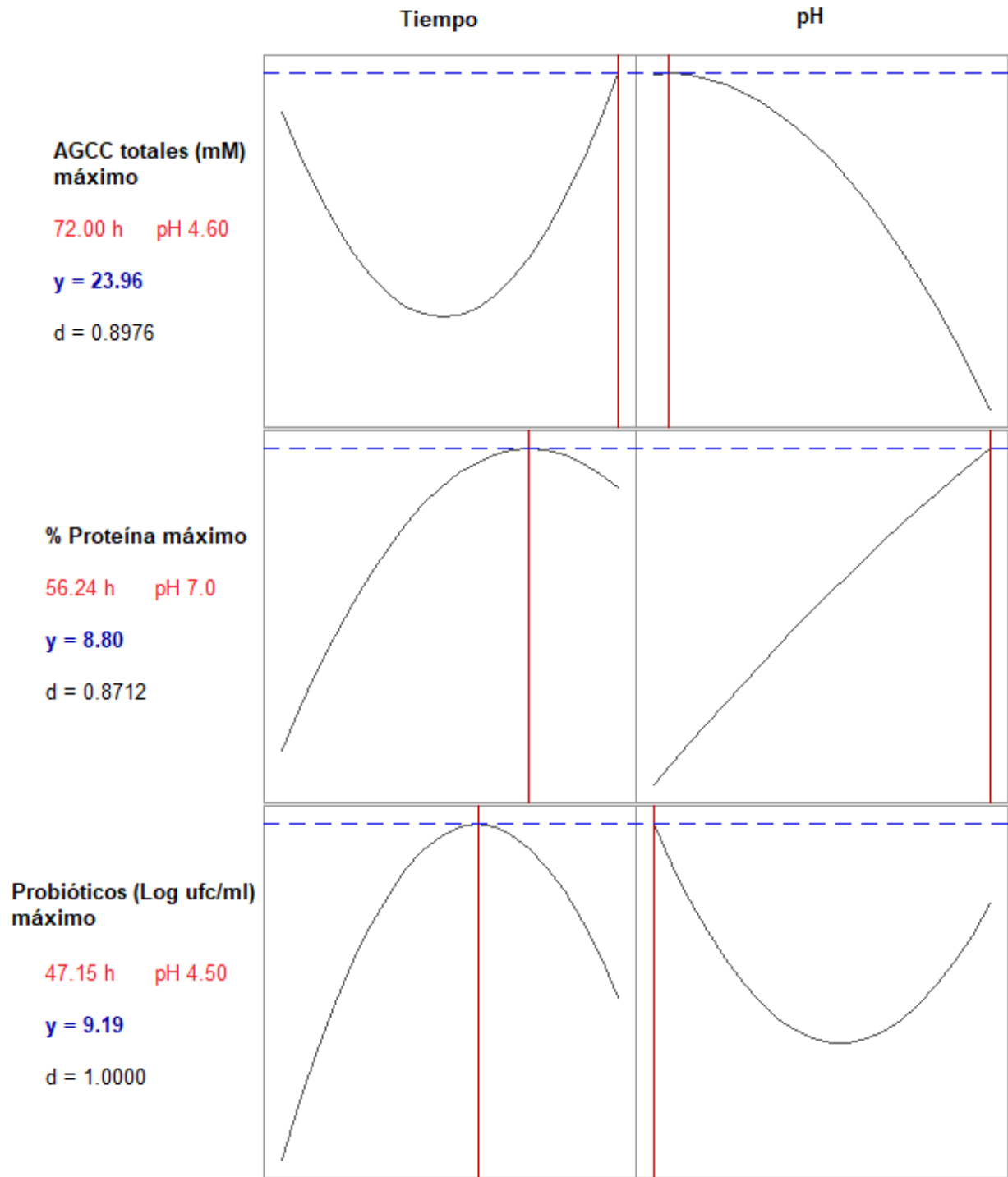


Figura 19. Condiciones óptimas de tiempo y pH inicial para maximizar el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, proteína y probióticos en la fermentación de maíz germinado.
 y: valores teóricos; d: deseabilidad.

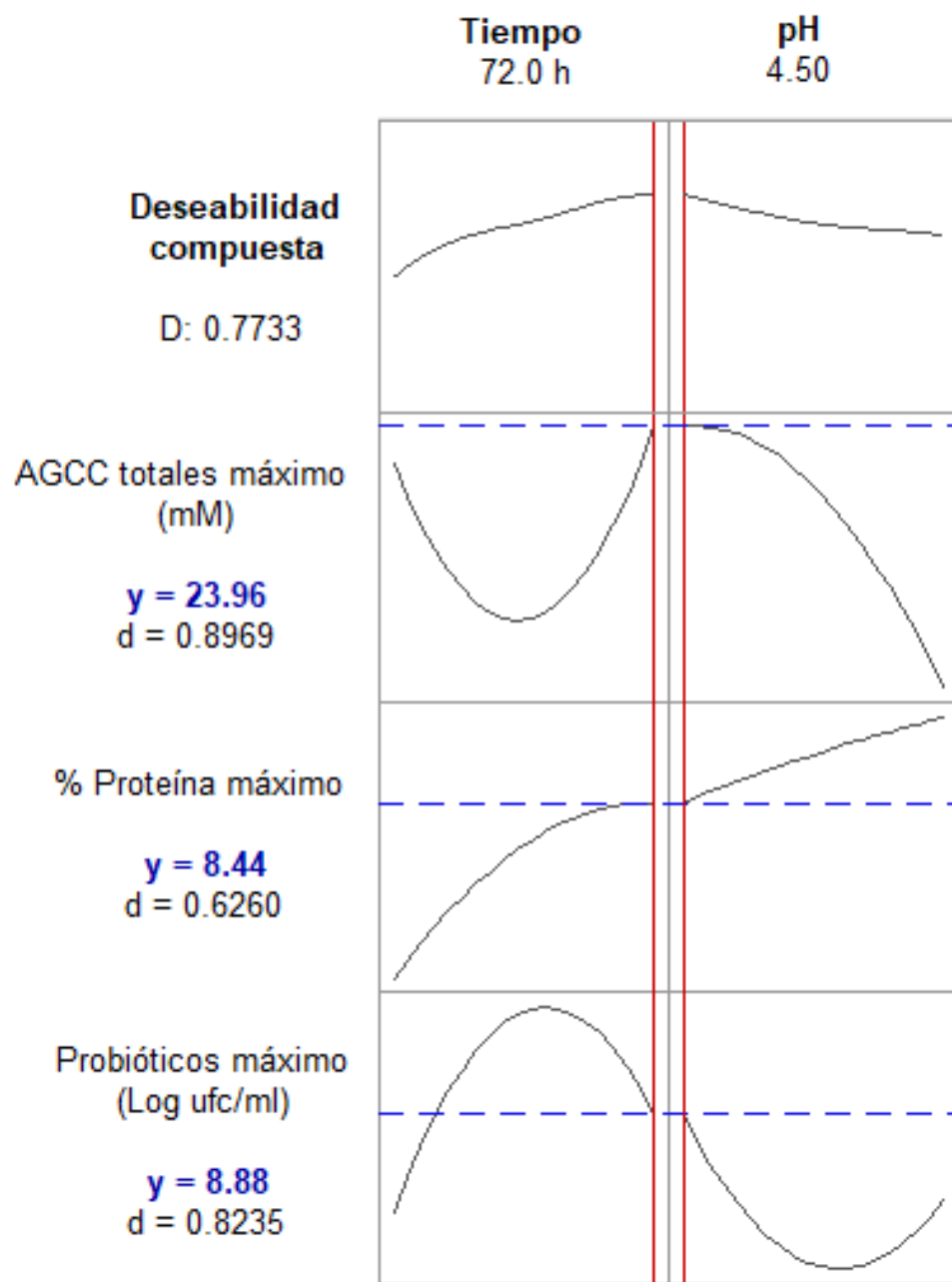
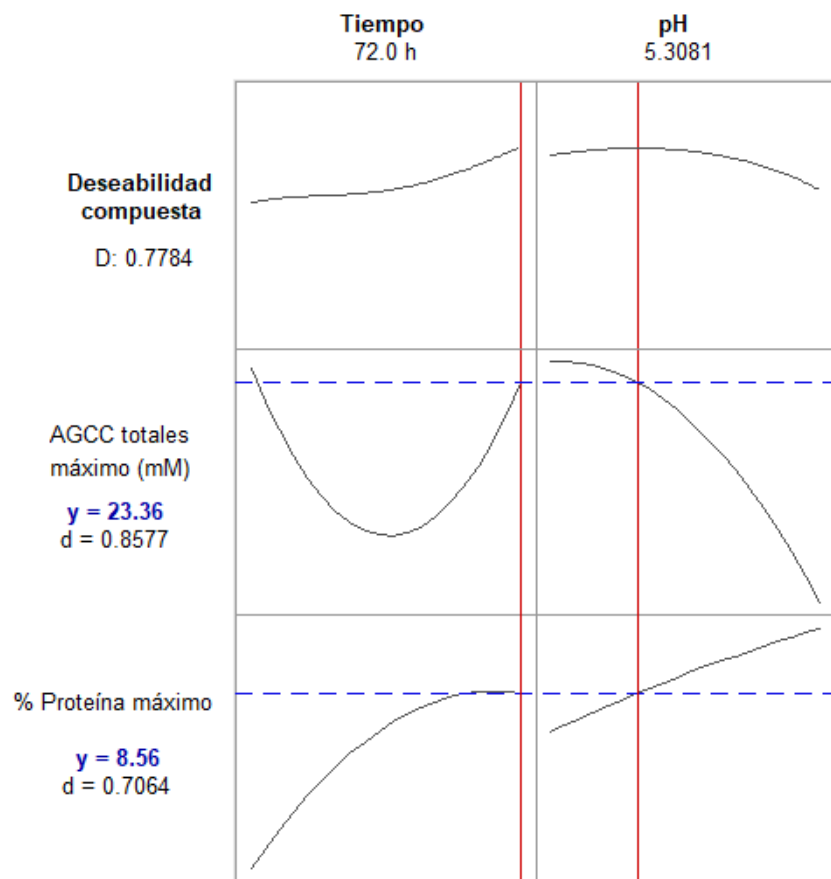


Figura 20. Condiciones óptimas para maximizar el contenido compuesto de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, proteína y probióticos.
y: valores teóricos; d: deseabilidad; D: deseabilidad compuesta.

a)



b)

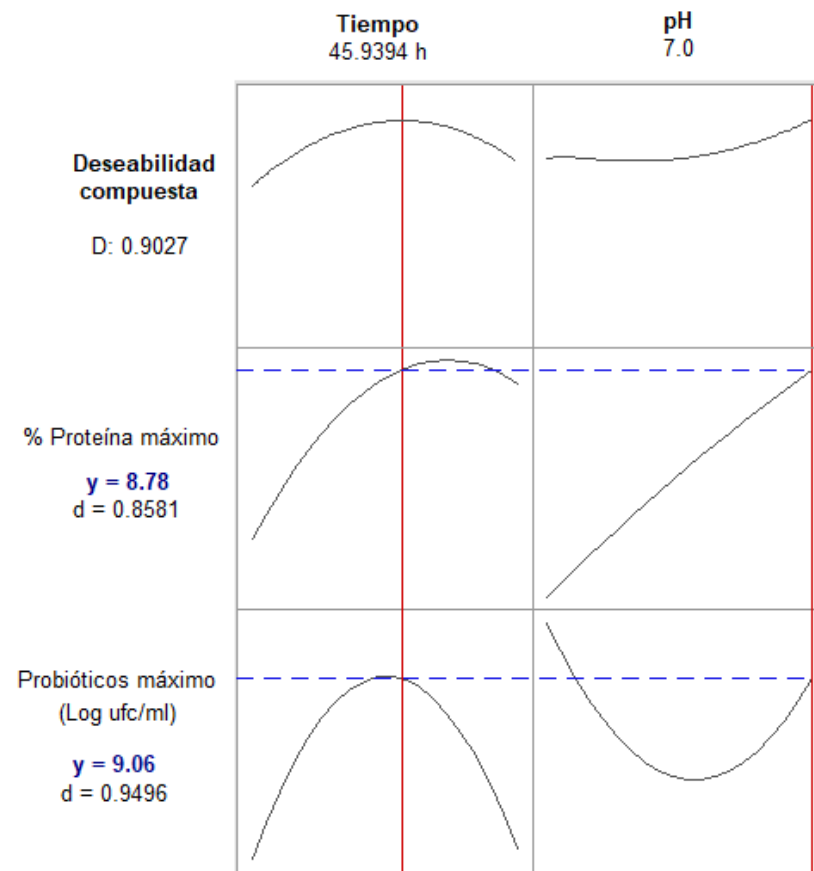


Figura 21. Condiciones óptimas para maximizar el contenido compuesto de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales y proteína (a) y el contenido compuesto de proteína y probióticos (b) en la fermentación de maíz germinado. y: valores teóricos; d: deseabilidad; D: deseabilidad compuesta.

8.4.4. Caracterización del fermento

Una vez definidas las condiciones, se llevó a cabo la fermentación para obtener la bebida probiótica y se realizaron diferentes análisis a la bebida a fin de caracterizarla. En la Tabla 18 se presentan las características fisicoquímicas que están relacionadas con la estabilidad del alimento. Se aprecia que el contenido de azúcares se redujo respecto al anterior a la fermentación (6.05 ± 0.08), la bebida es ácida considerando el pH y la acidez, además es un alimento de alta humedad y alto contenido de agua disponible.

Tabla 18. Características fisicoquímicas de la bebida de maíz germinado y fermentado.

pH	3.45 \pm 0.03
a _w	1.0001 \pm 0.0013
Acidez (g ácido láctico/100 g)	1.01 \pm 0.05
% Humedad	78.86 \pm 0.16

El contenido microbiano de la bebida se encuentra en la Tabla 19, se puede observar que no hubo presencia de microorganismos diferentes a los probióticos al inicio, tras la fermentación los probióticos aumentan y solo se observa contaminación con mesófilos aerobios en 0.7 log.

Tabla 19. Contenido microbiológico de la bebida de maíz germinado y fermentado al inicio y al final de la fermentación.

Microorganismo	Final (UFC/g)
Bacterias ácido lácticas	7.68 E+08 \pm 1.36 E+08
Mesófilos aerobios	5 \pm 10
Coliformes totales	0 \pm 0
Hongos y levaduras	0 \pm 0

El contenido nutrimental de la bebida fermentada se encuentra en la Tabla 20 contrastado con el del germinado de maíz y el maíz sin ningún tratamiento. Como se mencionó en el capítulo anterior, el germinado no presentó cambios respecto al maíz in tratar, no obstante, la fermentación del germinado de maíz si mostró un efecto en el contenido de algunos nutrientes: es notable una disminución en los carbohidratos y la ceniza y un aumento en la grasa y la proteína. En la Figura 22 se presenta la composición de AGCC en el maíz fermentado, los más abundantes fueron ácido acético, propiónico e isobutírico.

Tabla 20. Contenido nutricional del maíz sin tratamiento, el germinado de maíz y el maíz germinado y fermentado (bs).

	% Grasa	% Fibra cruda	% Proteína	% Ceniza	% Carbohidratos disponibles	% Azúcares
Maíz	3.57 ± 0.50 ^b	1.95 ± 0.18 ^a	6.32 ± 0.80 ^b	0.89 ± 0.28 ^b	87.11 ± 0.35 ^a	1.19 ± 0.15 ^c
Germinado	2.49 ± 0.48 ^b	2.42 ± 0.13 ^a	6.54 ± 0.54 ^b	1.12 ± 0.90 ^b	87.50 ± 0.41 ^a	4.29 ± 0.29 ^a
Germinado y fermentado	6.70 ± 0.34 ^a	1.97 ± 0.29 ^a	8.25 ± 0.29 ^a	2.32 ± 0.38 ^a	80.75 ± 0.18 ^b	2.37 ± 0.14 ^b

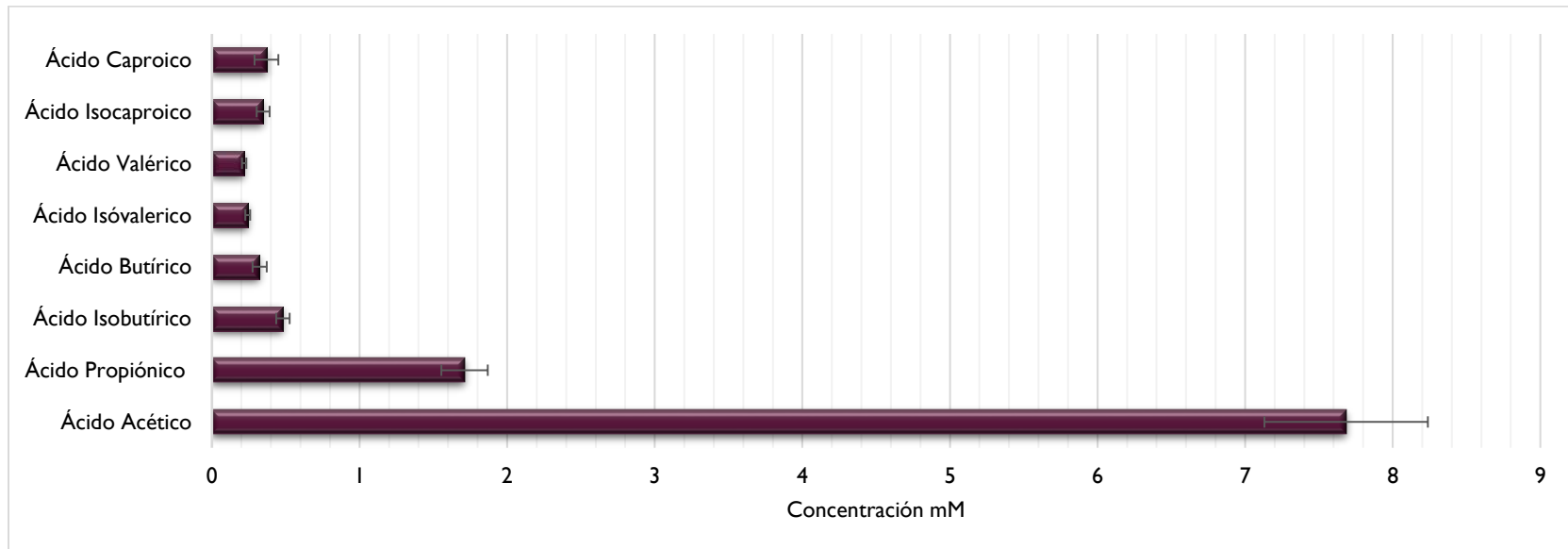


Figura 22. Perfil de ácidos grasos de cadena corta en el maíz germinado fermentado.

8.5. Discusión

8.5.1. Licuefacción

La hidrólisis de los almidones es un paso crítico en muchos procesos de fermentación, como en la elaboración de cervezas, por ejemplo, ya que provee los azúcares para el crecimiento de los microorganismos. Un buen entendimiento de las enzimas, ya sean endógenas o exógenas, es necesario para obtener buenos rendimientos y productos de alta calidad (Gomaa 2018). En los resultados de la etapa de licuefacción se aprecia que tras preparar las suspensiones aumenta la actividad de las α -amilasas, se soporta la posibilidad que se había planteado en el capítulo anterior de que en la fase de germinación la actividad enzimática se estanca debido a acumulación del producto, en este caso los azúcares reductores. Este efecto de inhibición de la amilasa por acumulación se ha visto en fermentaciones con altos rendimientos de azúcares, donde incluso se ha sugerido procesos simultáneos de fermentación y sacarificación para que el consumo simultaneo de los azúcares evite la acumulación de los productos finales (Mestres et al. 2017). Por otra parte, como consecuencia de la actividad de las amilasas se aprecia un aumento en el contenido de azúcares tras el paso de licuefacción, llegando a un 6.05% bs. En mostos cerveceros se ha reportado que el contenido de azúcares fermentables varía entre 6.89 - 9.56% de los sólidos totales de acuerdo al tipo de cerveza (Buckee y Hargitt 1978). En este contexto, el contenido de azúcares alcanzado queda por debajo del contenido de los mostos, esto podría deberse a la diferencia en la actividad enzimática en los granos ya que la cebada contiene la mayoría de las enzimas empleadas en procesos cerveceros (por ejemplo, β -glucanasas que el maíz no contiene) (Faltermaier et al. 2013), también cabe mencionar que muchos procesos cerveceros incluyen enzimas exógenas para mejorar los rendimientos lo cual podría hacer una diferencia. De igual modo, es posible que al prolongar el tiempo de licuefacción se obtengan porcentajes más altos de azúcares, próximas investigaciones pueden incluir un estudio más detallado de esta etapa, avocado en encontrar el tiempo óptimo de licuefacción que permita el contenido máximo posible de azúcares antes de que se presente el efecto de inhibición por acumulación de producto.

8.5.2. Fermentaciones preliminares

El objetivo de las fermentaciones preliminares fue seleccionar la bacteria a utilizar en la optimización, de modo que se llevaron a cabo fermentaciones previas con las dos bacterias que mostraron los mejores resultados en la evaluación como probióticos: *L. plantarum* V3 como *L. acidophilus* La3. En esta etapa se evaluó su habilidad para crecer en germinado de maíz, y durante las fermentaciones se monitoreo el contenido de proteína y AGCC debido a su importancia nutrimental y funcional respectivamente. En las cinéticas se observa que ambos microorganismos crecieron de forma similar en el maíz germinado y ambos alcanzaron altas concentraciones, que alcanzan la dosis generalmente reconocida para que los probiótico tengan un efecto benéfico que es de $> 6 \log$ (FAO/WHO 2002). Se encontraron aumentos significativos en el contenido de proteína respecto al germinado a las 48 y 72 h de fermentación en el caso de ambas bacterias. Algo que llama la atención es que se presenta una disminución en el contenido de proteína a las 12 h en la fermentación con *Lactobacillus plantarum* V3, Onweluzo y Nwabugwu (2009) reportan un comportamiento similar al fermentar mijo con su propia microbiota: a las 24 h el contenido de proteína fue más bajo que el del grano sin fermentar, ellos atribuyen esta disminución al aumento en el número de microorganismos metabolizando la proteína; posteriormente la proteína aumenta a las 72 h, sin embargo, en su caso el incremento no es estadísticamente diferente al del mijo sin fermentar. También se determinó que ambas bacterias son capaces de producir AGCC de una manera similar durante la fermentación del germinado de maíz, solo con un par de excepciones a las 48h: *L. acidophilus* La3 produjo más ácido isocaproico y *L. plantarum* V3 produjo más ácido butírico. No se encontraron diferencias significativas entre las bacterias en cuanto a la producción de AGCC ni en el aumento de la proteína y tuvieron un crecimiento similar, de modo que se seleccionó para la optimización de la fermentación a *L. acidophilus* La3 en base a que fue la bacteria con el mejor perfil en general en las pruebas funcionales descritas en el capítulo 1.

8.5.3. Optimización del pH inicial y tiempo de fermentación

8.5.3.1. Proteína

En la optimización se puede observar que la proteína tiende a aumentar en tiempos más largos de fermentación, incluso esto se hizo notar desde las fermentaciones preliminares.

Ya que *L. acidophilus* La3 no es una bacteria fijadora de nitrógeno, se cree que durante la fermentación la actividad hidrolítica de enzimas secretadas por las bacterias podría estar degradando estructuras celulares y compuestos complejos, de modo que esto podría mejorar la digestibilidad de la proteína y de este modo es posible cuantificar nitrógeno que estaba altamente ligado a la matriz, y debido a esto, inaccesible para ser digerido. Por otra parte, Yousif y El Tinay (2000) al fermentar maíz con su microbiota reportaron aumentos en la digestibilidad *in vitro* de 74.9% hasta un máximo de 93.5% a las 24 h de fermentación y un aumento en el contenido de proteína de 8.5 a 11.2%. Hiran y colaboradores (2016) fermentaron maíz con diferentes bacterias y encontraron aumentos de proteína de hasta 2 veces el contenido del grano sin fermentar, donde los valores más altos se alcanzaron a las 72 h, ellos atribuyeron dichos aumentos a la digestión de proteínas complejas de almacenamiento, como las prolaminas, en formas más solubles y a la biosíntesis de nutrientes por las bacterias. En otros estudios de fermentación de maíz se ha encontrado resultados similares respecto a que tiempos largos de fermentación favorecen el aumento en el contenido de proteína, el porcentaje de incremento varía en gran medida, pero una constante es que los valores de proteína máximos se encuentran entre las 48 y 72 h (Ongol et al. 2013; Gernah et al. 2011). Cabe mencionar que también hay estudios donde la fermentación no produce un incremento de proteína en sorgo y maíz (Asiedu et al. 1992; Pranoto et al. 2013), esto podría deberse a diferencias en la metodología, como el microorganismo empleado o el tipo o variedad del cereal.

También se encontró un aumento de la proteína a valores de pH más altos, esto podría estar relacionado con un aumento en su extractabilidad. Se ha determinado que el pH es uno de los factores más importantes para la extracción de las proteínas, alterando la tensión superficial, la solubilidad de la proteína y modificando (incluso rompiendo) las paredes celulares (Sari et al. 2015). Las proteínas vegetales tienen una solubilidad mínima a pH entre 4 y 5 (punto isoelectrico) y su solubilidad aumenta conforme sube el pH llegando a valores máximos entre pH 8 y 11 (Klupšaitė et al. 2015), por otra parte, se ha determinado que la solubilidad de las proteínas está fuertemente correlacionada con el rendimiento de extracción de estas (Preece et al. 2017). Es notable que la curva de proteína versus pH encontrada en este estudio tiene un comportamiento muy similar a las curvas de solubilidad y rendimiento de extracción de proteína versus pH reportadas por

diversos autores para diferentes proteínas vegetales (Amagliani et al. 2017; Çelik et al. 2019; Jarpa-Parra et al. 2014; Preece et al. 2017; Sari et al. 2015).

8.5.3.2. Probióticos

El comportamiento de los probióticos respecto al tiempo tiene una forma esperada de acuerdo a la curva de crecimiento bacteriano típico y a las fermentaciones preliminares, observándose el punto máximo a las 47.15 h, tras lo cual comienza la fase de muerte. Por otro lado, se encontró que los probióticos crecieron en mayor cantidad a pH cercano a 7.0 y 4.5, los valores intermedios entre estos fueron desfavorables. Que el contenido de bacterias fuera más elevado a pH 7 era un efecto que se podía esperar debido a que las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser capaces de sobrevivir o incluso crecer a pH ácido, sin embargo, su pH óptimo generalmente se encuentra cercano a la neutralidad (Russell y Diez-Gonzalez 1997). Se encontró que los probióticos crecieron también en altas cantidades a pH cercano a 4.5, se cree que esto puede deberse a que, por medio de hidrólisis ácida de los almidones y las proteínas, hay un mayor contenido de polisacáridos, azúcares y aminoácidos fáciles de metabolizar para las bacterias a pH bajo. Cook y Russell (1994) determinaron en *Streptococcus bovis* y *Lactococcus lactis* que a pH bajo (4.9 y 5.3 respectivamente) la producción de ATP se reducía debido a que las bacterias ya no podían llevar a cabo glucólisis y esto limitaba el crecimiento de las bacterias, también fue evidente que el pH que limita el anabolismo es diferente entre bacterias, siendo en este caso *L. lactis* la más sensible a la reducción del pH. Por otra parte, la hidrólisis ácida de los almidones se lleva a cabo a pH 3-5 obteniendo glucosa y azúcares reductores (Azmi et al. 2017), también se ha encontrado que el almidón de maíz puede hidrolizarse en un 26% en 72 h cuando es tratado con ácido sulfúrico 3.16 M a 35 °C (pH no reportado) (Utrilla-Coello et al. 2014); con base en esto, azúcares disponibles debido a hidrólisis ácida, es posible que las bacterias puedan continuar creciendo incluso si su metabolismo está reprimido por el pH.

Es interesante que diversos estudios han reportado diversos comportamientos respecto al pH para diferentes bacterias en diversas matrices, por ejemplo, se encontró mayor crecimiento a pH de 7.0 decreciendo conforme baja el pH en leche y jugo de manzana fermentados con *L. casei* (Mozzi et al. 1994; Pereira et al. 2011); en contraste, en una

fermentación de leche de soya negra con *L. brevis* se determinó que el crecimiento era mayor a pH 4.0 y 3.5 y disminuía ligeramente al irse acercando a 6.4, sin embargo al bajar el pH a 3.0 la cuenta total disminuía drásticamente (Ko et al. 2013); en otros estudios se muestra que a pH cercano a 4.0-4.5 y 6.0-7.0 el crecimiento de las bacterias es más bajo que a pH intermedio entre estos y los valores óptimos son variables, esto se ha visto en fermentaciones de suero de leche o melón con *L. casei*, medio de suero de leche y maltosa con *L. rhamnosus* y harina de okara con *L. plantarum* o *L. acidophilus* (Fonteles et al. 2012; Moraes et al. 2016; Rincon et al. 1993; Wang et al. 2020). Interesantemente, se ha encontrado que una misma bacteria puede tener un comportamiento diferente frente al pH en diferentes medios y que diferentes cepas de una misma bacteria pueden comportarse diferente en el mismo medio (Lechiancole et al. 2002). Esto evidencia que la matriz o medio tiene un efecto importante en el comportamiento de las bacterias, al respecto se ha descrito que los alimentos pueden tener un efecto de buffer, contener ingredientes funcionales que pueden interactuar con los probióticos y hacer variar sus propiedades funcionales y tecnológicas (Ranadheera et al. 2010), esto resalta la importancia de realizar optimizaciones de los procesos de fermentación de acuerdo con la matriz a fermentar y la bacteria específica a utilizar.

8.5.3.3. AGCC

Los AGCC totales y la mayor parte de los compuestos individuales presentan una disminución de las 12 a las 42 h después de lo cual comienzan a aumentar, una explicación a esto podría ser que durante las primeras horas lo que se aprecia es la degradación o pérdida por volatilización de los AGCC presentes en el maíz y posteriormente la producción por parte de las bacterias. La producción tardía de AGCC en las fermentaciones de maíz podría deberse a que estos compuestos son producidos por medio de fermentación anaerobia (Zhou et al. 2018) y en estas fermentaciones no se realizó algún paso para desplazar oxígeno, de modo que podría ser que a tiempos largos se acaba el oxígeno disuelto en la fase acuosa y esto da paso a la fermentación anaerobia. Esto es congruente con lo encontrado por Yang y colaboradores (2005), al fermentar maíz *in vitro* usando como inculo fluido de rumen encontraron un aumento en los AGCC (ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalerico y valerico) durante las primeras 6 h

después declinaron gradualmente para finalmente aumentar entre las 48 y 72 h, esto es muy parecido a lo observado, con la diferencia de que en el presente caso no es posible saber si hubo un incremento inicial ya que la optimización se llevó a cabo en un rango de 12 a 72 h. Otro dato interesante sobre ese estudio es que, aunque no reportan los AGCC iniciales, mencionan que sus datos están corregidos restando los valores de las 0 h de fermentación, lo que deja en evidencia que el grano de maíz los contiene desde antes de ser fermentado; en el mejor de nuestro conocimiento, no hay otros reportes sobre el contenido de AGCC en el grano de maíz sin fermentar. El comportamiento de disminución y posterior aumento es más marcado en el ácido acético, en contraste, los cambios en los ácidos propiónico y butírico son menos abruptos. La producción de ácido acético generalmente se lleva a cabo por la ruta del acetil-CoA a partir de piruvato, pero también puede ser generado a partir de ácido butírico o propiónico por medio de su oxidación o por la ruta acetogénica de reducción de protones (Zhou et al. 2018), de modo que este par de ácidos podrían estar formando ácido acético en las fermentaciones de maíz y por eso tener un aumento más pronunciado.

Se aprecia es una mayor producción de AGCC con pH inicial entre 5.0 y 5.5 en tiempos cortos de fermentación (12 h) o de 4.6 en el caso de tiempos largos (72 h), es relevante mencionar ambos puntos en el tiempo ya que, como se mencionó anteriormente, a esas horas se cuenta con la mayor cantidad de AGCC antes de que disminuyan y ya que aumentaron, respectivamente. Es bien sabido que el pH tiene un efecto importante en la ruta metabólica llevada a cabo por las bacterias, en gran parte debido a las enzimas que pueden estar activas. El pH óptimo de para enzimas hidrolíticas en fermentaciones ácido lácticas está reportado en un rango de 4 a 11 en diversos sustratos (Tang et al. (2016). Se ha estudiado también el efecto del pH inicial en la producción de AGCC en residuos de lodos activados y en la actividad de las enzimas clave para su producción (proteasa, α -glucosidasa, fosfo-trans acetilasa, acetato kinasa, oxaloacetato transcarboxilasa y CoA-transferasa), en este medio se hizo evidente que a pH 4.0 hubo actividad de las enzimas, disminuyendo a mayor pH hasta llegar a una actividad mínima a pH 8, tras lo cual se aprecia un incremento abrupto llegando a un punto máximo a pH 11; y el aumento de AGCC fue correspondiente con la actividad de las enzimas (Zhao et al. 2015). En pruebas con *Streptococcus bovis* se produjo ácido acético, fórmico y etanol a pH cercano a la

neutralidad, no obstante, al bajar el pH la fermentación pasó a ser homoláctica; de igual manera *Escherichia coli* cambió su producción de ácido acético, etanol y ácido fórmico por ácido láctico cuando el pH del medio fue acidificado (Russell y Diez-Gonzalez 1997). Es decir, el pH ácido favorece la producción de ácido láctico sobre la de otros ácidos o de alcohol, esto puede explicar por qué a pH cercano a 4.5 se encontró baja producción de AGCC. Por otro lado, la actividad de las enzimas asociadas a la producción de AGCC es baja a pH cercano a 7.0 y aumenta conforme se reduce el pH, a esto puede deberse que haya una baja producción de AGCC a pH 7.0. Entonces, el efecto neto que se aprecia es una mayor producción de AGCC con pH inicial entre 4.6 y 5.5 según el tiempo de fermentación.

Los ácidos isobutírico e isovalérico tuvieron comportamientos atípicos respecto al general de los AGCC, el primero incluso tiene un patrón contrario: hay la concentración es más alta a pH cercano a 4.5 y a 7.0 y permanece casi constante respecto al tiempo; por otra parte, el ácido isovalérico aumenta con el tiempo de fermentación y con pH cercano a 7.0, de una manera muy similar al del contenido de proteína. Algo que tienen en común los ácidos isobutírico, isovalérico es que sus precursores son aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) y no productos de la glucólisis (Koh et al. 2016), esta diferencia en su ruta metabólica podría explicar por qué su comportamiento frente al tiempo y el pH es diferente al del resto de los AGCC. En fermentaciones de maíces africanos con su propia microbiota se encontraron aumentos con el tiempo de diversos aminoácidos, incluyendo valina, leucina e isoleucina (Mohiedeen et al. 2010), así que el aumento de ácido isovalérico podría deberse a un incremento en la disponibilidad de sus precursores.

8.5.4. Condiciones óptimas compuestas

Se optimizaron las condiciones para obtener de manera simultánea el mayor contenido posible de proteína, probióticos y AGCC, sin embargo, las deseabilidades bajaron de 0.871, 1.000 y 0.897 a una deseabilidad compuesta de 0.773. De acuerdo a Minitab (2019), la deseabilidad “evalúa qué tan bien una combinación de variables satisface las metas que se definieron para las respuestas” la deseabilidad (d) evalúa una respuesta individual y la deseabilidad compuesta (D) un conjunto de respuestas en un rango de cero a uno. La deseabilidad compuesta de las tres variables fue baja y por tanto sus valores

máximos son reducidos en comparación con los valores máximos de las optimizaciones individuales, debido a esto, se decidió probar combinaciones de dos variables a la vez en lugar de tres para tratar de minimizar estas reducciones. Se dio prioridad a la proteína debido a su importancia nutrimental y teniendo en cuenta que el objetivo de optimizar las fermentaciones fue aumentar el contenido de proteína y obtener una bebida funcional con probióticos. Las condiciones óptimas para proteína y probióticos, y para proteína y AGCC dieron deseabilidades compuestas de 0.9027 y 0.7784, debido a esto, se decidió llevar a cabo la fermentación bajo las condiciones óptimas para el contenido compuesto de proteína y probióticos ya que la deseabilidad fue mayor, de este modo los máximos valores son similares a los contenidos que se obtendrían con la optimización individual (proteína 8.78 vs 8.81% y probióticos 9.06 vs 9.19 Log). Otra ventaja de las condiciones óptimas para proteína y probióticos es que requiere 26 h menos de fermentación que las condiciones para proteína y AGCC, lo que un enorme ahorro de tiempo de proceso. La baja deseabilidad compuesta de proteína y AGCC se puede atribuir a que el pH óptimo de estas variables es diametralmente opuesto (7.0 y 4.6 respectivamente), de modo que estas variables son difíciles de conciliar.

8.5.5. Validación del modelo

Se llevó a cabo la fermentación bajo las condiciones óptimas compuestas para proteína y probióticos con el fin de verificar si los contenidos obtenidos experimentalmente coincidían con los valores teóricos predichos por el modelo. Se determinó un contenido de proteína de 8.25 ± 0.29 % y de probióticos de 8.88 ± 0.08 Log, valores similares a los teóricos de 8.78% y 9.06 Log respectivamente.

8.5.6. Caracterización del fermento

8.5.6.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica

Se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica, microbiológica, nutrimental y de los AGCC de la bebida obtenida mediante la fermentación optimizada. Los valores de humedad y a_w encontrados fueron elevados, de acuerdo a su a_w , la bebida se considera un alimento de alta humedad al ser superior de 0.95 y es susceptible al crecimiento microbiano considerando que el límite para el crecimiento de estos es de 0.85 (FDA 2014). Por otra parte, se requiere un pH menor de 4.6 para la preservación de alimentos

por acidez, debido a su pH de 3.45, la bebida fermentada de maíz se puede considerar un alimento de baja acidez y cumple con el criterio para estabilidad por acidez (FDA 2020). Respecto a la regulación mexicana, se consultaron las normas oficiales para alimentos fermentados similares a fin de buscar especificaciones fisicoquímicas. La Norma Oficial Mexicana (NOM) sobre yogurt (NOM-181-SCFI/SAGARPA-2017) establece una acidez mínima de 0.5 % y por su parte la NOM referente a bebidas alcohólicas (NOM-199-SCFI-2017) marca para cervezas límites de pH 2.5 a 5 y de acidez máxima en 10 g/L, al respecto, la bebida fermentada de maíz cuenta con acidez y pH dentro de estos límites.

La caracterización microbiológica demuestra que la fermentación fue capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes, ya que no hubo recuentos de coliformes totales ni hongos y levaduras, y la carga de mesófilos aerobios se puede considerar baja. Al respecto, la NOM-218-SAA1-2011 establece que los límites máximos permisibles en bebidas no alcohólicas para mesófilos aerobios y coliformes totales son de 50 UFC/g y 10 NMP/g, con este criterio se puede establecer que la bebida es inocua y cumple con la normativa aplicable. Por otro lado, la NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018 dicta que el yogurt debe contener como mínimo 10^7 UFC/g de bacterias de los cultivos fermentativos, la bebida fermentada de maíz demostró contener 10^9 UFC/g de cultivos lácticos, que además de cumplir la norma, es superior a la dosis de 10^6 reconocida como necesaria para que los probióticos puedan ejercer un efecto benéfico en su hospedero (FAO/WHO, 2002), y cabe mencionar que *L. acidophilus* está listado en la norma como uno de los cultivos alternativos permitidos. La bebida fermentada de maíz no se puede denominar como yogurt, sin embargo, se menciona la norma de este alimento ya que no hay otra normativa mexicana que establezca el contenido mínimo de microorganismos para un alimento o bebida con probióticos.

8.5.6.2. Caracterización nutrimental

A diferencia de la germinación, la fermentación llevó a cambios significativos en el contenido nutrimental del maíz: el contenido de grasa aumentó en un 87.6%, el de proteína en un 30.5%, el de cenizas en 160% y hubo disminución en los carbohidratos en un 7.8%, todo esto en base seca. Al igual que sucede con la proteína, los reportes del efecto de la fermentación en grasa, fibra y ceniza de diversos cereales son variables, lo

que es una constante en todas las fermentaciones es la disminución de los carbohidratos debido a su consumo por los microorganismos. Sobre el maíz se han reportado que al fermentar a 30 °C por 24 con su microbiota aumentó la proteína de 10.6 a 12.04 % y las cenizas de 2.17 a 2.72% en tanto que la grasa disminuyó de 4.02 a 3.76% y la fibra de 2.12 a 1.78% (Gernah et al. 2011); en otro estudio maíz germinado se fermentó con *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* o *Bifidobacterium longum* a 37 °C por diferentes tiempos, a las 48 h con todas las bacterias se encontraron aumentos en el contenido de proteína y disminución en grasa, cenizas, fibra y carbohidratos (Hiran et al. 2016); al fermentar dos variedades diferentes maíz germinado con su microbiota durante 8 h a temperatura ambiente se encontraron importantes aumentos en el contenido de proteína de 5 y 8 % a 12.05 y 12.07%, en una variedad la grasa y la fibra disminuyeron, en tanto que en la otra se mantuvieron constantes estos nutrientes (Ongol et al. 2013). El pozol es una bebida mexicana similar a base de maíz nixtamalizado fermentado con su microbiota, se ha reportado que este proceso aumenta el contenido de grasa del maíz en un 22%, sin embargo, no se apreciaron cambios en el contenido de proteína, fibra y ceniza en base seca; debido a que los análisis se realizaron en 12 muestras comerciales, no se detallan las condiciones de elaboración (Guyot et al. 2004). El aumento en el contenido de grasa en el maíz germinado fermentado podría deberse a que la generación de biomasa demanda la producción de lípidos para la membrana plasmática de las nuevas células, esto es posible considerando que las bacterias pueden llevar a cabo biosíntesis de *novo* de ácidos grasos por medio del sistema de la ácido graso sintasa tipo II (Rock y Jackowski 2002). Por otra parte, con anterioridad se han discutido posibles mecanismos por los que aumenta contenido de proteína, es importante mencionar que, observando el contenido nutrimental, también se considera posible que la proteína aumente en algún grado por concentración debido a la disminución de los carbohidratos. La NOM NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018 establece que el yogurt bebible debe contener un mínimo de 1.6% de proteína, haciendo la conversión a base húmeda, la bebida fermentada de maíz germinado contiene 1.74% de proteína, con lo que cumple el requisito para el yogurt.

8.5.6.3. Contenido de AGCC

En comparación con un yogurt convencional, la bebida de maíz fermentada presenta ácidos acético y propiónico, por otro lado, ambos presentan ácido butírico y caproico.

Una comparación directa de las cantidades es difícil debido a que los resultados en yogurt son expresados en g /100 g de grasa o mg / g de grasa y faltan datos para realizar conversiones. Se encontraron diversos reportes sobre AGCC en yogurt de leche de vaca o cabra, sin embargo, en ninguno se menciona presencia de ácido acético o propiónico; a continuación, se mencionan los más relevantes. En yogurt de leche de vaca no se detectaron acético, propiónico ni butírico (Canbulat y Ozcan 2015). En otro estudio se encontró los ácidos butírico, caproico, caprilico, caprico y laurico en la leche, fue interesante que no se observaron cambios tras la fermentación para elaborar yogurt (Dave et al. 2002); estos mismos AGCC se reportan en leche y yogurt de cabra y se menciona que algunos de estos son compuestos clave en el sabor de dichos alimentos, en este caso se encontró que la fermentación de la leche aumentó el contenido de ácido caproico y caprilico (Jia et al. 2016).

Es necesario realizar investigaciones posteriores para evaluar qué cantidad de AGCC llegaría al intestino y cuantos son absorbidos al tomar la bebida probiótica de maíz fermentado, sin embargo, para poner en contexto las cantidades de AGCC presentes en la bebida, en seguida se mencionan dosis de AGCC a las que se han observado efectos fisiológicos en diversos estudios. Los AGCC tienen propiedades antiinflamatorias y se ha sugerido su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, un meta-análisis reporta pruebas con diferentes AGCC en un rango de 60-200 mM (McLoughlin et al. 2017), un estudio *in vitro* con la línea celular Colo320DM puso a prueba ácidos acético, propiónico y butírico en concentraciones de 30 mM encontrando que el propionato y el butirato fueron altamente efectivos, mientras que el ácido acético fue menos efectivo (Tedelind et al. 2007). Las concentraciones necesarias para obtener el efecto antiinflamatorio son muy elevadas en comparación con el contenido de AGCC en la bebida fermentada, en cambio, las concentraciones reportadas para tener efectos relacionados con la prevención de la diabetes y el control de peso si son alcanzadas por la bebida de maíz fermentado. El ácido acético, butírico y propiónico son capaces de promover la secreción de la hormona incretina, un péptido similar al glucagón, a concentraciones de 1 mM (Tolhurst et al. 2012). Canfora y colaboradores (2015) realizó una revisión de los efectos fisiológicos de los AGCC en el control de peso, algunos de los más notables es la reducción de la actividad lipolítica y un aumento en la adipogénesis,

que tienen como efecto neto menor liberación de ácidos grasos libres a nivel sistémico con la consecuente reducción de efectos lipotóxicos, inducción de la gluconeogénesis y aumento en la sensibilidad a la insulina. Para obtener dichos efectos metabólicos se reportan diferentes concentraciones: en un estudio se trató adipositos L1 con acetato o propionato a concentraciones 0.1-0.3 mM encontrando una reducción del 50% de la actividad lipolítica; el ácido acético 4 mM mostró efectos antilipolíticos en adipocitos 3T3-L1; al incubar explantes de tejido adiposo de humanos con sobrepeso con ácido propiónico 3 mM hubo un incremento en la expresión de la lipoproteína lipasa; se incrementó la expresión de la hormona leptina y su secreción en tejido subcutáneo humano y adipositos omentales tratados con ácido propiónico 3 mM.

8.6. Conclusiones

Tanto *Lactobacillus acidophilus* La3 como *L. plantarum* V3 son capaces de crecer en alta concentración durante la fermentación del maíz germinado, producir AGCC y promover aumentos significativos de proteína a tiempos entre 48 y 72 h de fermentación. El contenido de probióticos en las fermentaciones llegan a un punto máximo a tiempos de alrededor de 47 h y valores de pH inicial cercanos a 4.5 o a 7.0. Los tiempos de fermentación prolongados (72 h) y pH inicial cercano a 7.0 favorecen el aumento en el contenido de proteína. Respecto a los AGCC, concentraciones más elevadas se encuentran a tiempos muy cortos (12 h) o muy largos (72 h) de fermentación, por su parte, el pH inicial entre 4.6 y 5.5 puede ser más favorable según el tiempo de fermentación. Los valores de pH inicial óptimos para proteína y para AGCC son opuestos, de modo que es difícil conciliarlos estos factores, llevando esto a bajos valores de deseabilidad compuesta. Por el contrario, la optimización combinada para proteína y probióticos (pH 7.0 con 45.9 h) alcanza una deseabilidad compuesta alta (0.9027) y valores similares a los de las optimizaciones individuales, debido a esto y la importancia de ambos factores, se consideran estas las condiciones óptimas para elaborar la bebida probiótica.

La fermentación del maíz fue efectiva para aumentar el contenido de proteína en el maíz germinado y obtener una bebida con una dosis de bacterias mayor a 6 Log, que es la reglamentaria para considerarse probiótica. Además, la bebida cumple con las normas oficiales para bebidas similares para estándares fisicoquímicos y microbiológicos y puede

ser considerada inocua. En comparación con un yogurt para beber convencional, la bebida fermentada de maíz es competitiva en cuanto al contenido de proteína, probióticos y en el perfil de AGCC.

9. CONCLUSIONES GENERALES

- *Lactobacillus plantarum* V3 y *L. acidophilus* La3 demostraron ser capaces de sobrevivir a condiciones gástricas e intestinales *in vitro*, tienen la capacidad de adherirse a las células CaCo-2 y no muestran más resistencias a antibióticos de lo requerido entre los antibióticos probados, por lo tanto, estas bacterias pueden considerarse probióticos.
- La germinación del maíz no mejora su contenido nutrimental, sin embargo, aumenta la cantidad de azúcares y nitrógeno amino libre y la actividad de las α -amilasas obteniendo los mejores resultados a las 96 h de germinación. Estos cambios favorecen la susceptibilidad del maíz a ser fermentado.
- Las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* La3 como *L. plantarum* V3 son capaces de crecer en alta concentración durante la fermentación del maíz germinado, producir AGCC y promover aumentos significativos de proteína a tiempos entre 48 y 72 h de fermentación, a 37 °C.
- La optimización combinada para maximizar el contenido de proteína y probióticos mediante la fermentación se obtuvo a pH 7.0 con 45.9 h.
- La fermentación del maíz con *Lactobacillus acidophilus* La3 fue efectiva para aumentar el contenido de proteína en el maíz germinado y obtener una bebida con una dosis de bacterias probióticas mayor a 6 Log.
- La bebida derivada de la fermentación del maíz germinado cumple con las normas oficiales para bebidas similares en cuanto a estándares fisicoquímicos y microbiológicos y puede ser considerada inocua.
- Debido al contenido de probióticos presentes en la bebida fermentada de maíz, esta se puede considerar como una bebida funcional, además, considerando las concentraciones de AGCC que contiene, podría tener un efecto en la prevención de la diabetes y el control de peso.

10. PERSPECTIVAS

Se necesita más investigación para evaluar si la resistencia a los antibióticos mostrada por los probióticos propuestos es transferible a otras bacterias horizontalmente, es decir, a otras bacterias diferentes a su progenie.

Aunque no se encontraron incrementos en el contenido de proteína durante la germinación, es probable que el perfil de aminoácidos haya mejorado, también es posible que su bioaccesibilidad y digestibilidad así como la de compuestos antioxidantes y otros fitoquímicos hayan aumentado, por lo tanto, podría ser un tema a explorar en próximos estudios. De manera similar, el contenido de fibra cruda no mostró cambios, sin embargo, es posible encontrar diferencias al analizar por métodos que cuantifiquen fibra dietaria en lugar de fibra cruda, considerando que esta última no incluye la fracción soluble, así que esto también podría ser sujeto a posterior análisis.

Ya que cuatro cepas de diferentes bacterias comprobaron tener características de probióticos, una posible área a explorar es la fermentación con diferentes clusters de estas bacterias para observar efectos en la dinámica de fermentación, efectos en el metabolismo de las bacterias y posibles efectos simbióticos.

Investigaciones posteriores pueden evaluar la calidad de la proteína tras la fermentación del maíz germinado en condiciones óptimas, para evaluar posibles mejoras en el perfil de aminoácidos y en la digestibilidad.

Aun son necesarias pruebas *in vivo* para validar los efectos del consumo de la bebida, la sobrevivencia de las bacterias al paso del tracto gastrointestinal, la posterior producción de AGCC por los probióticos en intestino, la estabilidad y la absorción de los AGCC presentes en la bebida y los efectos fisiológicos de los AGCC tanto de la bebida como de los producidos por los probióticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Achi, O. K., & Ukwuru, M. (2015). Cereal-based fermented foods of Africa as functional foods. *International Journal of Microbiology and Application*, 2(4), 71-83.
- Addo, A., Bart-Plange, A., & Dzisi, K. (2006). Water absorption characteristics of obatanpa and mamaba maize hybrids (*Zea mays*). *International Journal of Food Engineering*, 2(3).
- Adlerberth, I., Ahrne, S. I. V., Johansson, M. L., Molin, G., Hanson, L. A., & Wold, A. E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7), 2244-2251.
- Agarry, S. E., Afolabi, T. J., & Akintunde, T. T. Y. (2014). Modelling the water absorption characteristics of different maize (*Zea mays* L.) types during soaking. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(5), 1.
- Agu, R. C. (2003). Some relationships between malted barleys of different nitrogen levels and the wort properties. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), 106-109.
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in food science & technology*, 64, 1-12.
- Ampe F, Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP. (1999). Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol*, 65(12):5464-5473.
- Anderson, T., Lamsal, B. (2011). Zein Extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. *Cereal Chem.* 88, 159–173.
- AOAC International. (1995). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Va: AOAC International.

- Apolinário, A. C., de Lima Damasceno, B. P. G., de Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., & da Silva, J. A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate polymers*, 101, 368-378.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., & Ben Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London (ON, Canada) April 30 and May 1. [ftp. fao.org/es/esn/food/wgreport2. pdf](ftp://fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf)>(pp. 1e11).
- Asiedu, M., Nilsen, R., Lie, Ø., & Lied, E. (1993). Effect of processing (sprouting and/or fermentation) on sorghum and maize. I: proximate composition, minerals and fatty acids. *Food chemistry*, 46(4), 351-353.
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O., García-Lara, S., & Pérez-Carrillo, E. (2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food hydrocolloids*, 35, 471-475.
- Azmi, A. S., Malek, M. I. A., & Puad, N. I. M. (2017). A review on acid and enzymatic hydrolyses of sago starch. *International Food Research Journal*, 24(12), 265-273.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4):493-6.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135-142.
- Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., Stagnari, F., & Galieni, A. (2019). Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*, 11(2), 421.

- Bento-Silva A, Vaz Pattoa MC, Bronze MR. (2018). Review Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chemistry* 246: 360–378
- Beuchat, L. R., & Scouten, A. J. (2002). Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of Salmonella and Escherichia coli O157: H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 382-395.
- Bhauso S, Khan MK. (2011). Germinated brown rice as a value added rice product: A review *J Food Sci Technol*, 48(6):661–667
- Bhavbhuti M. Mehta, Afaf Kamal-Eldin, Robert Z. Iwanski (2012). *Fermentation: Effects on Food Properties Chemical & Functional Properties of Food Components*. CRC Press, pp. 2
- Biazus, J. P. M., Souza, R. R. D., Márquez, J. E., Franco, T. T., Santana, J. C. C., & Tambourgi, E. B. (2009). Production and characterization of amylases from Zea mays malt. *Brazilian archives of Biology and technology*, 52(4), 991-1000.
- Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36:527–543.
- Boffill Rodríguez, Y., Gallardo Aguilar, I., & de Almeida e Silva, J. (2017). Estudio del desarrollo del nitrógeno amino libre durante el malteado del sorgo. *Centro azúcar*, 44(2), 39-47.
- Bruslik, N. L., Akhatova, D. R., Toimentseva, A. A., Abdulkhakov, S. R., Ilyinskaya, O. N., & Yarullina, D. R. (2015). Estimation of probiotic lactobacilli drug resistance. *Antibiotiki i Khimioterapiia Antibiotics and Chemoterapy [sic]*, 60(3-4), 6-13.
- Buckee, G. K., & Hargitt, R. (1978). Measurement of Carbohydrates in Wort and Beer—A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 84(1), 13-21.
- Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., & Frias, J. (2014). Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food chemistry*, 152, 407-414.

- Canbulat, Z., & Ozcan, T. (2015). Effects of Short-Chain and Long-Chain Inulin on the Quality of Probiotic Yogurt Containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 1251-1260.
- Candela, M., Maccaferri, S., Turrone, S., Carnevali, P., & Brigidi, P. (2010). Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 93-101.
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 577.
- Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A review. *Journal of clinical gastroenterology*, 53, S1-S41.
- Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., & Yáñez Fernández, Jorge. (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, vol. 7, no 2, p. 107-117.
- Çelik, M., Güzel, M., & Yildirim, M. (2019). Effect of pH on protein extraction from sour cherry kernels and functional properties of resulting protein concentrate. *Journal of food science and technology*, 56(6), 3023-3032.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., & Collins, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61, 1636–1643.
- Chaudhary DP, Kumar S, Langyan S. (2014). Chapter 1 Nutritive Value of Maize: Improvements, Applications and Constraints. *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Springer. India, pp. 3-17.
- Chaves-López C, Serio A, Grande-Tovar CD, Cuervo-Mulet R, Delgado-Ospina J, Paparella A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13:1031-1048.
- Cho, D. H., & Lim, S. T. (2016). Germinated brown rice and its bio-functional compounds. *Food Chemistry*, 196, 259-271.

- Chu, D., & Barnes, D. J. (2016). The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
- CLSI (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Connelly, P. (2008). *Lactobacillus plantarum*--a literature review of therapeutic benefits. *Journal of the Australian Traditional-Medicine Society*, 14(2).
- Cook, G. M., & Russell, J. B. (1994). The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology*, 28(3), 165-168.
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl. Environ. Microbiol*, 71(6):3060-3067.
- Costabile, A., Deaville, E. R., Morales, A. M., & Gibson, G. R. (2016). Prebiotic potential of a maize-based soluble fibre and impact of dose on the human gut microbiota. *PLoS One*, 11(1).
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International journal of food microbiology*, 115(1), 35-42.
- Dave, R. I., Ramaswamy, N., & Baer, R. J. (2002). Changes in fatty acid composition during yogurt processing and their effects on yogurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(3), 197.
- De Vries, M. C. (2006). *Analyzing global gene expression of Lactobacillus plantarum in the human gastrointestinal tract*. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. ISBN: 90-8504-344-1.
- Díaz-Ruiz G, Guyot JP, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C. (2003a). 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. *Appl. Environ. Microbiol*, 69(8):4367-4374.
- Diaz-Ruiz G., Guyot Jean-Pierre, Ruiz-Teran F., Morlon Guyot Juliette, Wachter C. (2004). Amylolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementary foods? *Food-based approaches for a healthy nutrition*, 11:23-28.
- Dordević TM, Šiler-Marinković SS, Dimitrijević-Branković SI. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals, *Food Chem.*, 119, 957-963.
- Dziedzoave, N. T., Graffham, A. J., Westby, A., & Komlaga, G. (2010). Comparative assessment of amylolytic and cellulolytic enzyme activity of malts prepared from tropical cereals. *Food control*, 21(10), 1349-1353.
- El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T. (2017). Emerging Trends in “Smart Probiotics”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8:1889.
- Erdeve O, Tiras U, Dallar Y. (2004). The Probiotic effect of *Saccharomyces boulardii* in a pediatric age group. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(4):234–238.
- Euromonitor International. (2012a). Impact of New EU Regulations on Functional Food/Drink Claims Part 3: Opportunities and Challenges.
- Fageer AS, Babiker EE, Tinay AH. (2004). Effect of malt pretreatment and/or cooking on phytate and essential amino acids contents and *in vitro* protein digestibility of corn flour. *Food Chemistry* 88:261–265
- Faltermaier, A., Waters, D., Becker, T., Arendt, E., & Gastl, M. (2014). Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(1), 1-15.
- FAO/WHO Working Group. (2002). Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations Canada, pp. 2-3.

- FAOSTAT. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Crop statistics, (online). Disponible en:
<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Farnworth ER. (2005). The Beneficial Health Effects of Fermented Foods-Potential Probiotics around the World, *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 4(3-4):93-117.
- FDA, National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (1999). Microbiological safe evaluations and recommendations on sprouted seeds. Disponible en:
<http://www.fda.gov/food/foodsafety/productspecificinformation/fruitsvegetablesjuices/ucm078789.htm#sprout>. Accesado el 19 Julio 2019.
- FDA. (2014). Water Activity (aw) in Foods. Inspection technical guides. Dept. of Health, Education, and Welfare Public Health Service Food and Drug Administration *ORA/ORO/DEIO/IB* Consultado el 30 marzo 2021.
<https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods>
- FDA. (2020). Code of Federal Regulations Title. Food and Drugs Chapter I--Food and Drug Administration Department of Health and Human Services Subchapter B - Food for human consumption. Part 114 Acidified Foods. Consultado el 30 marzo 2021.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114&showFR=1&subpartNode=21:2.0.1.1.14.3>
- Felten, A., Barreau, C., Bixet, C., Lagrange, H., & Philippon, A. (1999). Lactobacillus species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J. Clin. Microbiol.* 37, 729–733.
- Feng, P. (1997). A summary of background information and foodborne illness associated with the consumption of sprouts. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC, 96-99.

- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del-Río, I., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2016). Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*, 25, 511-522.
- Figueroa, C., Narváez, G., Mauricio, S., Taba, S., Gaytán, M., Véles, M., Rincón, F., & Aragón, C. (2013). Physical kernel properties and quality of racial groups of maize landraces of México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36 (Suppl. 3-A), 305-314.
- FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario. Maíz. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Fideicomisos en Relación con la Agricultura. México, pp. 15.
- Fonteles, T. V., Costa, M. G. M., de Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2012). Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2819-2826.
- Franz, C. M., Huch, M., Mathara, J. M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., & Holzapfel, W. H. (2014). African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 84-96.
- Gadaga TH, Mutukumira AN, Narvhus JA, Feresu SB. (1999). A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1):1-11.
- Gernah, D. I., Ariaahu, C. C., & Ingbian, E. K. (2011). Effects of malting and lactic fermentation on some chemical and functional properties of maize (*Zea mays*). *American Journal of food technology*, 6(5), 404-412.
- Gibson G. R., & Roberfroid M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*;125:1401–12.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.

- Gil, M. I., Marín, A., Andujar, S., & Allende, A. (2016). Should chlorate residues be of concern in fresh-cut salads?. *Food Control*, 60, 416-421.
- Gomaa, A. M. (2018). Application of enzymes in brewing. *J. Nutr. Food Sci. Forecast*, 1(5).
- Gonzalez M. (2017). *Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales*. Lulu Enterprices. Carolina del Norte, USA, pp. 101-103.
- Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, Roshkova ZG, Webb C. (2000). Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry*, 36(1–2): 127-130.
- Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JA. (2010b). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 292-302.
- Granato, D. , Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. d. and Shah, N. P. (2010a), Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 455-470. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x
- Guan, X., Xu, Q., Zheng, Y., Qian, L., & Lin, B. (2017). Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 730-739.
- Guo, B. Z., Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Lax, A. R., Cleveland, T. E., Russin, J. S., Mehta, A. D., Selitrennikoff, C. P., and Widstrom, N. W. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* 87:1174-1178.
- Guyot JP, Trèche S, Rio1 D, Espinosa J, Centurión D, Wachter C. (2003). Pozol, a popular Mexican traditional beverage made from a fermented alkaline cooked maize dough. *Food-based approaches for a healthy nutrition*, 11:23-28.
- Guyot, J. P., Trèche, S., Rio, D., Espinosa, J., Centurión, D., & Wachter, C. (2004). Pozol, a popular Mexican traditional beverage made from a fermented alkaline cooked maize dough.

- Haard NF, Odunfa SA, Lee CH, Quintero-Ramírez R, Lorence-Quiñones A, Wachter-Radarte C. (1999). Fermented cereals. A global perspective. FAO Agricultural Services Bulletin. Roma, No. 138, pp. 27-42.
- Habschied, K., Šarkanj, B., Krstanović, V., Tišma, M., & Kramarić, M. (2014). Development of enzymatic activity in wheat grain during germination process. In 7th International Congress Flour-Bread'13 and 9th Croatian Congress of Cereal Technologists, 16-18 October 2013, Opatija, Croatia. Proceedings (pp. 304-311). Josip Juraj Strossmayer University, Agriculture Faculty in Osijek.
- Hamad AM, Fields ML. (1979). Evaluation of the protein quality and available lysine of germinated and fermented cereals. *Journal Of Food Science*, 44(2): 456-459
- Hamed IM, Hussein MM. (2017). Influence of Processing and fermentation on chemical composition, total phenolic and phytic acid of some cereals and legumes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 8(1):335-341.
- Harrabi S, St-Amand A, Sakouhi F, Sebei K, Kallel H, Mayer PM, Boukhchina S. (2008). Phytosterols and phytostanols distributions in corn kernel. *Food Chemistry* 111:115–120
- Helland, M. H., Wicklund, T., & Narvhus, J. A. (2004). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 305-313.
- Herrera J, Alizaga R, Guevara E, Jimenez V. (2006). Germinación Y Crecimiento de la Planta. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica, pp. 18.
- Hijova, E., & Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárske listy*, 108(8), 354.
- Hill, A. E., & Stewart, G. G. (2019). Free Amino Nitrogen in Brewing. *Fermentation*, 5(1), 22.
- Hiran, P., Kerdchoechuen, O., & Laohakunjit, N. (2016). Combined effects of fermentation and germination on nutritional compositions, functional properties and volatiles of maize seeds. *Journal of Cereal Science*, 71, 207-216.

- Holmberg, J., Hämäläinen, J. J., Reinikainen, P., & Olkku, J. (1997). A mathematical model for predicting the effects of the steeping programme on water uptake during malting. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(3), 177-182.
- Hounhouigan DJ, Nout MJR, Nago CM, Houben JH, Rombouts FM. (1999). Use of starter cultures of lactobacilli and yeast in the fermentation of mawe, an African maize product. *Tropical Sci.* 39:220–226.
- Hübner F, Arendt EK. (2013). Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 53:8, 853-861.
- Hübner F, O’Neil T, Cashman KD, Arendt EK. (2010). The influence of germination conditions on beta-glucan, dietary fibre and phytate during the germination of oats and barley. *Eur Food Res Technol* 231:27–35.
- Hung, P. V., Maeda, T., Yamamoto, S., & Morita, N. (2012). Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 667-672.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33-48.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., & Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11), 4949-4956.
- Jan R, Saxena DC, Singh S. (2017). Effect of germination on nutritional, functional, pasting, and microstructural properties of chenopodium (*Chenopodium album*) flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41:12959.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., & Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 461-469.

- Jia, R., Chen, H., Chen, H., & Ding, W. (2016). Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *Journal of dairy science*, 99(1), 221-227.
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1), 15-20.
- Jones SE, Versalovic J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9:35-43.
- Karovičová, Z. K. J., & Kohajdova, J. (2007). Fermentation of cereals for specific purpose. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46(2), 51-57.
- Katla, A. K., Kruse, H., Johnsen, G., & Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International journal of food microbiology*, 67(1-2), 147-152.
- Kazanas N, Fields WL. (1981). Nutritional Improvement of Sorghum by Fermentation. *Journal of Food Science*, 46:819- 821.
- Kennedy JG. (1963). Tesguino Complex: the role of beer in Tarahumara culture. *American Anthropologist*, 65: 620-640.
- Klose C, Arendt Ek. (2012). Proteins in Oats; their Synthesis and Changes during Germination: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:629–639.
- Klupšaitė, D., & Juodeikienė, G. (2015). Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. *Chemical Technology*, 66(1), 5-12.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345.
- Kohajdová Z, Karovičová J. (2007). Fermentation of cereals for specific purpose. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46(2):51-57.

- Koll, P., Mändar, R., Smidt, I., Hütt, P., Truusalu, K., Mikelsaar, R. H., Shchepetova, J., Krogh-Andersen, K., Marcotte, H., Hammarström, L., & Mikelsaar, M. (2010). Screening and evaluation of human intestinal lactobacilli for the development of novel gastrointestinal probiotics. *Current microbiology*, 61(6), 560-566.
- Kos B, Suskovic J, Vukovic´ S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. (2003). *Journal of Applied Microbiology*, 94:981–987
- Kuhnen S, Menel Lemos PM, Campestrini LH, Bernardi Ogliari J, Diasc PF, Maraschin M. (2011). Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. *J Sci Food Agric* 2011; 91: 1548–1553.
- Lang, M. M., Ingham, B. H., & Ingham, S. C. (2000). Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157: H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *International journal of food microbiology*, 58(1-2), 73-82.
- Lappe P, Ulloa M. (1989). Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesguino tarahumara. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp. 5-11.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L., Verhoeven, T.L., Marien, E., Ossowski, I.V., Reunanen, J., Palva, A.M., Vos, W.M., Keersmaecker, S.C., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 185-93.
- Lechiancole, T., Ricciardi, A., & Parente, E. (2002). Optimization of media and fermentation conditions for the growth of *Lactobacillus sakei*. *Annals of microbiology*, 52(3), 257-274.
- Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y., L^e, K., Van den Broeck, H. C., Brouns, F. J.P.H., De Brier, N. & Delcour, J. A. (2019). Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 305-328.

- Lending CR, Kriz AL, Larkins BA, Bracker CE. (1988). Structure of Maize Protein Bodies and Immunocytochemical Localization of Zeins. *Protoplasma* 143:51-62
- Lodha ML. (2014). Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses. CAPITULO 3. Maize Protein Quality and Its Improvement: Development of Quality Protein Maize in India. Springer India, pp. 40.
- M Astbury, S., & M Corfe, B. (2012). Uptake and metabolism of the short-chain fatty acid butyrate, a critical review of the literature. *Current drug metabolism*, 13(6), 815-821.
- MacEvilly, C. (2003). CEREALS Contribution to the Diet. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Academic Press. Pages 1008-1014.
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67-72.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102.
- Markowiak, P., & Slizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9 (9): 1021.
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Mathur S, Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3):281-295.
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
- Mattucci, S. (2015). Sprouted grains add nutrition and new flavors to products. Retrieved from <http://www.mintel.com>

- Maziya-Dixon, B. B., Kling, J. G., & Okoruwa, A. E. (2000). Physical, chemical and water absorption characteristics of tropical maize hybrids. *African Crop Science Journal*, 8(4), 419-428.
- McLoughlin, R. F., Berthon, B. S., Jensen, M. E., Baines, K. J., & Wood, L. G. (2017). Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 106(3), 930-945.
- McMaster LD, Kokott SA, Reid SJ, Abratt VR. (2005). Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2):231-237.
- Meeske, R., Basson, H., (2000). A comparison of the yield, nutritional value and predicted production potential of different maize hybrids for silage production. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 30, 18–21.
- Mendis, M., Leclerc, E., & Simsek, S. (2016). Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate polymers*, 139, 159-166.
- Mendoza-Elos, M., Moran-Vázquez, N., Andrio-Enríquez, E., López-Benítez, A., Rodríguez-Herrera, S., Castañón-Nájera, G., (2007). Efecto del nitrógeno y la densidad de población en el contenido de lisina en la semilla de maíz en México. *Agron. Mesoam.* 18, 177–183.
- Mestres, C., de JC Bettencourt, M., Loiseau, G., Matignon, B., Grabulos, J., & Achir, N. (2017). Modeling cereal starch hydrolysis during simultaneous saccharification and lactic acid fermentation; case of a sorghum-based fermented beverage, gowé. *Food Research International*, 100, 102-111.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Min M, Bunt CR, Mason SL, Hussain MA. (2018): Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2018.1462760

- Minitab, (2019). ¿Qué es deseabilidad individual y deseabilidad compuesta? <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/using-fitted-models/supporting-topics/response-optimization/what-are-individual-desirability-and-composite-desirability> consultado el 29 de marzo de 2021.
- Mohiedeen, I. E., Tinay, A. H. E., Elkhalya, A. E. O., Babiker, E. E., & Mallasiy, L. O. (2010). Effect of fermentation on in vitro protein digestibility, protein fractions and amino acids composition of maize (*Zea mays* Linnaeus) cultivars. *Elec. Journal of Environmental and Agriculture Food Chemistry*, 9, 838-847.
- Molin, G. (2001). Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 380s-385s.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. Á. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 531-541.
- Montville, R., & Schaffner, D. W. (2004). Analysis of published sprout seed sanitization studies shows treatments are highly variable. *Journal of food protection*, 67(4), 758-765.
- Moraes Filho, M. L., Busanello, M., & Garcia, S. (2016). Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. *LWT*, 74, 456-464.
- Mozzi, F., De Giori, G. S., Oliver, G., & De Valdez, G. F. (1994). Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, 49(12), 667-669.
- Nanson NJ, Field ML. (1984). Influence of temperature on the nutritive value of lactic acid fermented cornmeal. *Journal of Food Science*, 49, 958–959.

- Narváez-González E D, J D C Figueroa, S Taba, E T Castaño, R Martínez-Peniche (2007b) Efecto del tamaño del gránulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:269-277.
- Natural Products Insider. (2017). Formulating Snacks & Bars. *Snacks & bars Magazine*, 7(23):15.
- Nelson, K., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., & Mathai, M. (2013). Germinated grains: a superior whole grain functional food?. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(6), 429-441.
- Nkhata, S. G., Ayua, E., Kamau, E. H., & Shingiro, J. B. (2018). Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2446-2458.
- NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma Mexicana. Dirección general de normas.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba (cancela a la NOM-181-SCFI-2010).
- NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Nuraida L, Wachter MC, Owens JD. (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(5):567-571.

- Nyanzi, R., & Jooste, P. J. (2012). Cereal-based functional foods. *Probiotics*, 161-197.
- Ongol, M. P., Niyonzima, E., Gisanura, I., & Vasanthakaalam, H. (2013). Effect of germination and fermentation on nutrients in maize flour. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 23(4), 183-188.
- Onweluzo, J. C., & Nwabugwu, C. C. (2009). Fermentation of millet (*Pennisetum americanum*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds for flour production: Effects on composition and selected functional properties. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(6), 737-744.
- Onyango C, Okoth MW, Mbugua SK. (2003). The pasting of lactic-fermented and dried uji (an East African sour porridge). *J. Sci. Food Agric.* 83:1412–1418.
- Palacios Rojas, N. (2018). Calidad nutricional e industrial de maíz: laboratorio de calidad nutricional de maíz “Evangelina Villegas”: protocolos.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*, 52(12):7577–7587
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food research international*, 44(5), 1276-1283.
- Pineiro M, Stanton C. (2007). Probiotic Bacteria: Legislative Framework— Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*, 137(3):850S-853S.
- Pineiro M, Stanton C. (2007). Probiotic Bacteria: Legislative Framework— Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*, 137(3):850S–853S.
- Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic bacteria: legislative framework— requirements to evidence basis. *The Journal of nutrition*, 137(3), 850S-853S.
- Pranoto, Y., Anggrahini, S., & Efendi, Z. (2013). Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on in-vitro protein and starch digestibilities of sorghum flour. *Food Bioscience*, 2, 46-52. Ko, C. Y., Lin, H. T. V., & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus*

- brevis FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48(4), 559-568.
- Preece, K. E., Hooshyar, N., & Zuidam, N. J. (2017). Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 163-172.
- Puertollano, E., Kolida, S., & Yaqoob, P. (2014). Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 17(2), 139-144.
- Pyo YH, Lee TC, Lee YC. (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with b-glucosidase-producing lactic acid bacteria, *Food Res. Int.*, 38, 551-559.
- Radosavljević, M., Bekrić, V., Božović, I., & Jakovljević, J. (2000). Physical and chemical properties of various corn genotypes as a criterion of technological quality. *Genetika*, 32(3), 319-329.
- Rajendran, S. R. C. K., Okolie, C. L., Udenigwe, C. C., & Mason, B. (2017). Structural features underlying prebiotic activity of conventional and potential prebiotic oligosaccharides in food and health. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), e12389.
- Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1):1-7.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international*, 43(1), 1-7.
- Ray RC, Didier M. (2014). *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. Food Biology Series. CRC Press, pp. 1-2.
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 30(1), 17-25.
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*,

- Rincon, J., Fuertes, J., Moya, A., Monteagudo, J. M., & Rodriguez, L. (1993). Optimization of the fermentation of whey by *Lactobacillus casei*. *Acta biotechnologica*, 13(4), 323-331.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137(3), 830S-837S.
- Rock, C. O., & Jackowski, S. (2002). Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(5), 1155-1166.
- Rombeau, J. L., Kripke, S. A., & Settle, R. G. (1990). Short-Chain Fatty Acids. In *Dietary Fiber* (pp. 317-337). Springer, Boston, MA.
- Russell, J. B., & Diez-Gonzalez, F. (1997). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in microbial physiology*, 39, 205-234.
- Russell, J. B., & Diez-Gonzalez, F. (1997). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in microbial physiology*, 39, 205-234.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola nacional 2017-2030, maíz grano blanco y amarillo*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México, pp. 2.
- Sakharam, K., (2004). Corn processing industry coproducts: issues and challenges, Part II. *Cereal Food. World* 49, 102–104.
- Salminen S, Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(2): 93-106.

- Sanjeev P, Chaudhary DP, Sreevastava P, Saha S, Rajenderan A, Sekhar JC, Chikkappa GK. (2014). Comparison of Fatty Acid Profile of Specialty Maize to Normal Maize. *Journal of American Oil Chemical Society* 91:1001–1005.
- Saravana Bavan D, Mohan Kumar GC. (2012). Morphological and Thermal Properties of Maize Fiber Composites. *Fibers and Polymers*, 13(7):887-893.
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1138-1157.
- Schiffrin E, Parlesak A, Bode C, Bode JC, Van't Hof MA, Grathwohl D, Guigoz Y. (2008). Probiotic yogurt in the elderly with intestinal bacterial overgrowth: Endotoxaemia and innate immune functions. *British Journal of Nutrition*, 101(7):961-966.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- Scouten, A. J., & Beuchat, L. R. (2002). Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 668-674.
- Serna-Saldivar, S. O. (2016). Cereals: dietary importance. *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press. Pages 703-711.
- Shah TR, Prasad K, Kumar P. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2:1-9.
- Sharma, N., Goyal, S. K., Alam, T., Fatma, S., Chaoruangrit, A., & Niranjana, K. (2018). Effect of high pressure soaking on water absorption, gelatinization, and biochemical properties of germinated and non-germinated foxtail millet grains. *Journal of cereal science*, 83, 162-170.

- Sheehan VM, Ross P, Fitzgerald GF. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2): 279-284.
- Shutu X, Dalong Z, Ye C, Yi Z, Shah T, Ali F, Qing L, Zhigang L, Weidong W, Jiansheng L, Xiaohong Y, Jianbing Y. (2012). Dissecting tocopherols content in maize (*Zea mays* L.), using two segregating populations and high-density single nucleotide polymorphism markers *BMC Plant Biology*, 12:201-214.
- Sikin, A. M., Zoellner, C., & Rizvi, S. S. (2013). Current intervention strategies for the microbial safety of sprouts. *Journal of food protection*, 76(12), 2099-2123.
- Sindhu, SC, Khetarpaul, N. (2001). Probiotic fermentation of indigenous food mixture: Effect on antinutrients and digestibility of starch and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14:601-609.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51:456-467.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.
- Steinkraus KH. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8:311-317.
- Steinkraus, Keith. (1983). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 220-225.
- Stewart, M. L., Nikhanj, S. D., Timm, D. A., Thomas, W., & Slavin, J. L. (2010). Evaluation of the effect of four fibers on laxation, gastrointestinal tolerance and serum markers in healthy humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 56(2), 91-98.
- Tagawa, A., Muramatsu, Y., Nagasuna, T., Yano, A., Imoto, M., & Murata, S. (2003). Water absorption characteristics of wheat and barley during soaking. *Transactions of the ASAE*, 46(2), 361.

- Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2016). Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Management*, 52, 278-285.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(20), 2826.
- Thevenot, C., Lauriere, C., Mayer, C., Simond-Cote, E., & Daussant, J. (1992). α -Amylase changes during development and germination of maize kernels. *Journal of plant physiology*, 140(1), 61-65.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F. & Gribble, F. M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61(2), 364-371.
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81(3), 1031-1064.
- Tripathi MK, Giri SK. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9:225-241.
- Urias-Lugo DA, Heredia JB, Serna-Saldivar SO, Muiy-Rangel MD, Valdez-Torres JB. (2015). Total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity of native and elite blue maize hybrids (*Zea mays* L.), *CyTA - Journal of Food*, 13:3, 336-339.
- Utrilla-Coello, R. G., Hernández-Jaimes, C., Carrillo-Navas, H., González, F., Rodríguez, E., Bello-Perez, L. A., ... & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydrate polymers*, 103, 596-602.

- Vallabha VS, Tiku PK. (2013). Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(2):161-168.
- Van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Delaedt, Y., Onagbesan, O., Decuypere, E., Buyse, J., De Ketelaere, B., Broekaert, W. F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2008). Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *The Journal of nutrition*, 138(12), 2348-2355.
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- Vasudha S, Mishra HN. (2013). Non-dairy probiotic beverages. *International Food Research Journal*, 20(1): 7-15.
- Vega-Villasante, F., Soria, H. G. N., & Civera, R. (1993). The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I-Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology--Part B: Biochemistry and*, 106(3), 547-550.
- Verdugo Valdez AG, Schlie Guzmán MA, Moreno Andrade SU, Gutiérrez Jiménez J. (2008). Recursos fitogenéticos y sustentabilidad en Chiapas. Las bebidas fermentadas tradicionales. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, pp. 105-111.
- Verma, R. C., & Prasad, S. (1999). Kinetics of absorption of water by maize grains. *Journal of Food Engineering*, 39(4), 395-400.
- Vijaya B, Vijayendra SVN, Reddy OVS. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *J Food Sci Technol*, 52: 6112.
- Vikal Y, Chawla JS. (2014). Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses. Chapter 4 Molecular Interventions for Enhancing the Protein Quality of Maize. Springer India, pp. 49.

- Vinderola CG, Reinheimer JA. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9):895-904.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- Wacher C, Cañas A, Bárzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17:251-256
- Wacher C. (1995). Capítulo 4: características y microbiología de pozoles tradicionales. *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp. 40-59.
- Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. In *Bacterial adhesion* (pp. 17-34). Springer, Dordrecht.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., & Hammes, W. P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2578-2585.
- Wang CY, Wu SJ, Shyu YT. (2014). Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(4):449-456.
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2017). Mild thermal treatment and in-vitro digestion of three forms of bovine lactoferrin: Effects on functional properties. *International Dairy Journal*, 64, 22-30.
- Wang, T., Lu, Y., Yan, H., Li, X., Wang, X., Shan, Y., Yi, A., Liu, B., Yuan Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43(3), 515-528.

- West NP, Horn PL, Pyne DB, Gebiski VJ, Lahtinen SJ, Fricker PA, Cripps AW. (2013). Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals, *Clinical Nutrition*, xxx:1-7.
- Xiang N, Guo X, Liu F, Li Q, Hu J, Stephen C. (2017). Effect of Light- and Dark-Germination on the Phenolic Biosynthesis, Phytochemical Profiles, and Antioxidant Activities in Sweet Corn (*Zea mays* L.) Sprouts *Int. J. Mol. Sci.*, 18:1246-1259.
- Yang, H. J., Tamminga, S., Williams, B. A., Dijkstra, J., & Boer, H. (2005). In vitro gas and volatile fatty acids production profiles of barley and maize and their soluble and washout fractions after feed processing. *Animal Feed Science and Technology*, 120(1-2), 125-140.
- Young VR, Pellett PL. (1994). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am J Clin Nutr* 59(5):1203S–12S.
- Yousif NE, Tinay AH. (2000). Effect of fermentation on protein fractions and *in vitro* protein digestibility of maize. *Food Chemistry*, 70:181-184.
- Yousif, N. E., & El Tinay, A. H. (2000). Effect of fermentation on protein fractions and *in vitro* protein digestibility of maize. *Food chemistry*, 70(2), 181-184.
- Yu, S. M., Lee, Y. C., Fang, S. C., Chan, M. T., Hwa, S. F., & Liu, L. F. (1996). Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant molecular biology*, 30(6), 1277-1289.
- Zhang H, Vasanthan T, Wettasinghe M. (2007). Enrichment of Tocopherols and Phytosterols in Canola Oil during Seed Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 355-359
- Zhao, J., Yang, Q., Li, X., Wang, D., An, H., Xie, T., Xu, Q., Deng, Y. & Zeng, G. (2015). Effect of initial pH on short chain fatty acid production during the anaerobic fermentation of membrane bioreactor sludge enhanced by alkyl polyglucoside. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 283-289.

Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource technology*, 248, 68-78.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Iris Margarita García Núñez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MAÍZ GERMINADO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS.

Campo de estudio: Ciencia y Tecnología de Alimentos

Datos personales: Nacida en Monterrey, N.L. el 15 de mayo de 1990, hija de Rodolfo García Guerrero y Margarita Núñez Ramírez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencias de los Alimentos en 2011, primer lugar en la generación. Egresada del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, grado obtenido Maestra en Ciencias con Especialidad en Biotecnología en 2014.

Experiencia Profesional: Gerente de R&D en Idrapower S.A. de C.V. Jefe de innovación y desarrollo en la empresa Tega Foods durante 2 años. Investigador asociado en proyecto de innovación en la empresa Griffith Foods durante 1 año. Ingeniero de desarrollo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas (CIDPRO) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Coordinador de proyectos de Innovación en la empresa Laboratorios Griffith durante 1 año.