



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESTUDIO DE CAMBIOS ESTRUCTURALES Y EN
ALGUNOS COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE LA
ELABORACIÓN DE TEGÜINO DE MAÍZ AZUL (Zea
mays)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

M. EN C. DENI NAVA ARENAS

DIRECTORES DE TESIS:

DR. HUMBERTO HERNANDEZ SANCHEZ

DR. ANTONIO JIMENEZ APARICIO



MÉXICO, D.F. MAYO 2009

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Graduados en Alimentos, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo de los proyectos:

Estudio de algunos cambios en los compuestos fitoquímicos del maíz azul (<i>Zea mays L</i>) durante su procesamiento biotecnológico.	CGPI 2005 Clave 2005 0137
--	------------------------------

Estudio de algunos cambios en compuestos fenólicos del maíz azul durante la elaboración de tesgüino	CGPI 2006 Clave 2006 0568
---	------------------------------

Así como de:

Beca Institucional para estudios de Doctorado.	Febrero 2005 – Julio 2006
--	---------------------------

Beca CONACyT para estudios de Doctorado.	Agosto 2006 – Diciembre 2008
--	------------------------------

Apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores.	Febrero 2005 – Diciembre 2007
--	-------------------------------

Beca Institucional para Tesis de Doctorado.	Febrero 2009 – Julio 2009
---	---------------------------

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN ALIMENTOS

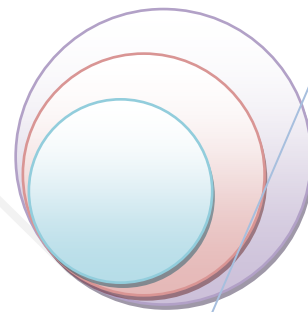
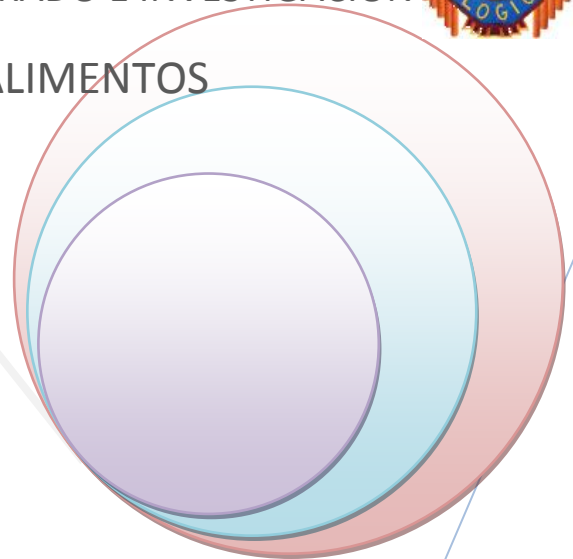
**ESTUDIO DE CAMBIOS
ESTRUCTURALES Y EN ALGUNOS
COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE
LA ELABORACIÓN DE TEGÜINO DE
MAIZ AZUL (Zea mays)**

TESIS DE DOCTORADO

DIRECTOR DE TESIS Y CONSEJERO DE ESTUDIOS:
DR. HUMBERTO HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR:
DR. ANTONIO JIMENEZ APARICIO

PRESENTA: M. EN C. DENI NAVA ARENAS



RESUMEN

La producción de alimentos fermentados es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antiguas, a pesar de ello, aún sigue vigente pues es a partir de estos procesos que se obtienen productos no solo con características sensoriales muy apreciadas sino, con características nutricionales tales que en muchos casos ubican a estos alimentos dentro del grupo de lo probióticos, en este contexto, los cereales son consideradas buenas fuentes de nutrientes para el crecimiento de microorganismos probióticos siendo además por si mismos considerados como prebióticos. En este trabajo se estudió el proceso de producción de un fermentado de maíz de origen mexicano denominado Tescüino cuya elaboración incluye las etapas de germinación del grano, molienda y cocción del atole y fermentación; se determinaron las variaciones en antocianinas, compuestos fenólicos totales, actividad de secuestro de radicales libres (DPPH y ABTS) , estructura (durante la germinación) y color a lo largo del proceso así como crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y etanol durante la fermentación. El tescüino fue elaborado con maíz azul. Se determinaron las condiciones de germinación más adecuadas que fueron: 24 h de remojo, 200g agua/ 100g de grano, T=25 °C y 96h de totales de germinación. En cuanto los cambios estructurales, fueron analizados usando la metodología de análisis de imagen encontrándose que bajo las condiciones de experimentación, las magnitudes de humedad, área y diámetro de Feret aumentan conforme avanza el tiempo de germinación presentando las mismas tendencias, la dimensión fractal del área del grano con respecto al tiempo, presenta un comportamiento caracterizado por la aparición de tres picos, el primero correspondiente a la absorción rápida de agua y el tercero al surgimiento de la radícula momento en el cuál, la germinación del grano es percibida visualmente, en tanto, el segundo pico, de forma tentativa, corresponde al comienzo de la formación de la radícula en el interior del grano por lo que se propone que, el grano ha germinado cuando su dimensión fractal tiene un máximo entre las 72 y 76 horas del proceso. Con respecto a la cantidad de compuestos fenólicos aumenta durante la etapa de germinación, disminuye considerablemente en la cocción y aumenta en la fermentación obteniéndose un incremento global de 101% mientras que la cantidad de antocianinas aumenta ligeramente durante la germinación del maíz y disminuye drásticamente durante la cocción para mantenerse constante en la fermentación, la pérdida global de estos pigmentos es de 43%. La actividad de secuestro de radicales libres está relacionada directamente a la cantidad de compuestos fenólicos totales, en forma global, se obtuvo una pérdida de 20% con respecto al maíz sin procesar. Se encontraron cambios importantes en el color dependiendo de la etapa de producción, sin embargo, aunque es posible registrarlos instrumentalmente, no coinciden necesariamente con la percepción sensorial humana. Fue posible ajustar al modelo logístico el crecimiento de L. plantarum y S. cerevisiae en medios MRS y YM respectivamente. Ambos microorganismos crecieron de forma simultánea en el mosto de fermentación, habiendo producido cantidades representativas de etanol y ácido láctico. Las características sensoriales del tescüino elaborado en el laboratorio, son similares a las del tejuino producido y comercializado por la población mestiza de algunas zonas de México. El tescüino producido en el laboratorio, al ser elaborado con maíz azul, puede aportar beneficios adicionales a la adquisición de nutrientes esenciales (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales), protegiendo al cuerpo humano del daño oxidativo producido por los factores ambientales de estrés.

ABSTRACT

The fermented foods production is one of the food-processing technologies oldest, nevertheless, it still applies because it is from these products which are obtained not only with sensory characteristics highly valued, but with features such as nutritional often located at these foods in the group of probiotics in this context, the grains are considered good sources of nutrients for the growth of probiotic microorganisms by themselves is also considered as prebiotics. In this paper we studied the process of producing a fermented maize called Mexican Tescüino whose development includes the stages of germination of the grain, milling and baking and fermentation of atole, identified variations in anthocyanins, total phenolics, activity of sequestration of free radicals (DPPH and ABTS), structure (for germination) and color throughout the process as well as microbial growth, production of lactic acid and ethanol during fermentation. The corn was developed tescüino blue. Identified the most suitable conditions for germination were: 24 h of soaking, water 200g / 100g grain, T = 25 ° C for 96h and total germination. As structural changes were analyzed using the methodology of image analysis shows that, under experimental conditions, the magnitudes of moisture, area and Feret diameter progresses increase the germination time by presenting the same trends, the fractal dimension of the area grain with respect to time, presents a behavior characterized by the appearance of three peaks, the first corresponding to the rapid absorption of water and the third time of radicle emergence in which the germination of the grain is perceived visually, while The second peak, so attempt it at the beginning of the formation of the radicle in the grain and it is therefore proposed that the grain has germinated when its fractal dimension has a maximum between 72 and 76 hours of the process. With regard to the amount of phenolic compounds increases during germination decreases significantly in the firing and increases in the fermentation produces an overall increase of 101% while the amount of anthocyanins increased slightly during the germination of corn and decrease during the cooking to keep constant during the fermentation, the total loss of these pigments is 43%. The activity of free radicals hijacking is directly related to the amount of total phenolic compounds, in aggregate form, showed a loss of 20% compared to raw corn. We found significant changes in color depending on the stage of production, however, although it is possible instrumental record, not necessarily human sensory perception. It was possible to adjust the logistic growth model for *L. plantarum* and *S. cerevisiae* MRS and YM media, respectively. Both microorganisms grew simultaneously in the fermenting wort, having produced representative quantities of ethanol and lactic acid. Sensory characteristics of the tescüino developed in the laboratory are similar to those of tejuino produced and marketed by the mestizo population in parts of Mexico. The tescüino produced in the laboratory, to be produced with blue corn, can bring additional benefits to the acquisition of essential nutrients (carbohydrates, proteins, fats, vitamins and minerals), protecting the human body from oxidative damage caused by environmental factors of stress.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	2
2.1 Cereales.	2
2.2 Maíz.	2
2.2.1 Composición química del maíz.	4
2.3 Cereales fermentados.	6
2.4 Tescüino.	7
2.5 <u>Lactobacillus plantarum</u>	12
2.6 <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	17
2.7 Germinación.	22
2.8 Antioxidantes.	24
2.9 Compuestos fenólicos.	28
2.10 Antocianinas	30
2.11 Actividad antioxidante de las antocianinas.	34
2.12 Antocianinas como colorantes.	36
2.13 Antocianinas de maíz.	37
2.14 Color en los alimentos.	39
2.15 Análisis de imagen.	47
2.16 Dimensión fractal.	49
3. JUSTIFICACIÓN	52
4. HIPÓTESIS	53
5. OBJETIVOS	53
5.1 Objetivo general	53
5.2 Objetivos específicos.	53
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	54
7. MATERIALES	56
7.1 Materia prima.	56
7.2 Cepas.	56
7.3 Equipo.	57
7.4 Instrumental.	57
7.5 Reactivos.	57
8. MÉTODOS	58
8.1 Caracterización del grano de maíz.	58
8.1.1 Aspecto	58

	PÁGINA
8.1.2 Impurezas.	58
8.1.3 Peso Hectolítrico	58
8.1.4 Viabilidad del grano.	58
8.1.5 Energía germinativa.	59
8.1.6 Capacidad germinativa	59
8.1.7 Humedad, proteínas, extracto etéreo y fibra cruda.	59
8.2 Mantenimiento de cepas.	59
8.3 Proceso de obtención del tesgüino.	59
8.4 Extracción y determinación del contenido de compuestos fenólicos totales	60
8.5 Curva tipo de ácido ferúlico.	61
8.6 Curva tipo de ácido gálico.	62
8.7 Extracción de antocianinas y determinación del contenido de antocianinas totales.	62
8.8 Actividad de secuestro de radicales libres.	63
8.8.1 Determinación de la actividad de secuestro de radicales libres mediante la técnica de DPPH.	66
8.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la técnica de ABTS.	67
8.9 Determinación de ácido láctico.	72
8.10 Determinación de etanol.	72
8.11 Obtención de las curvas de crecimiento microbiano	73
8.12 Adquisición de imágenes.	73
8.13 Análisis de imagen y cálculo de dimensión fractal.	74
8.14 Determinación de color	76
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
9.1 Caracterización del maíz azul usado como materia prima.	77
9.2 Determinación de las condiciones de germinación más adecuadas.	80
9.3 Determinación de las condiciones de elaboración del tesgüino en el laboratorio.	82
9.4 Cambios de humedad durante el proceso de elaboración del tesgüino.	84
9.5 Cambios estructurales del grano de maíz con respecto al tiempo de germinación.	87
9.6 Cambios en la cantidad de compuestos fenólicos totales durante el proceso de elaboración del tesgüino.	100
9.7 Cambios en la cantidad de antocianinas totales durante el proceso de elaboración del tesgüino.	104
9.8 Cambios en la capacidad de secuestro de radicales libres durante el proceso de elaboración del tesgüino.	109
9.9 Cambios de color durante el proceso de elaboración de tesgüino.	120
9.10 Cinéticas de crecimiento microbiano para la etapa de fermentación del proceso de elaboración de tesgüino.	129
9.11 Producto terminado.	136
10. CONCLUSIONES	137
11. BIBLIOGRAFÍA	139

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Principales partes estructurales del grano de maíz	5
Figura 2. Diagrama de elaboración tradicional de tesgüino elaborado con base en lo reportado por Lappe y Ulloa. (1987)	10
Figura 3. Secuencia de reacciones de la fermentación alcohólica.	20
Figura 4. Etapas de la germinación de una semilla	23
Figura 5. Clasificación de los compuestos fenólicos fundamentada en su estructura química.	29
Figura 6. Esqueleto C ₆ C ₃ C ₆ de los flavonoides.	31
Figura 7. Estructura del 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio.	32
Figura 8. Diagrama de cromaticidad para el iluminante C	43
Figura 9. Diagrama representativo del sistema cilíndrico CIELCH	45
Figura 10. Diagrama de flujo del desarrollo experimental correspondiente a la estandarización del proceso de elaboración de tesgüino.	55
Figura 11. Fotografía de <u>L. plantarum</u> obtenida de un frotis teñido con tinción de Gram (100X)	56
Figura 12. Fotografía de <u>S. cerevisiae</u> obtenida de un frotis teñido con safranina (100X)	56
Figura 13. Valores considerados de los parámetros para la elaboración de tesgüino de maíz azul durante este trabajo.	83
Figura 14. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de germinación de maíz azul para la elaboración de Tesgüino.	85
Figura 15. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de cocción del Lote 1 de germinado de maíz azul para la elaboración de Tesgüino.	85
Figura 16. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de cocción del Lote 2 de germinado de maíz azul para la elaboración de Tesgüino.	86
Figura 17. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de fermentación para la elaboración de Tesgüino de maíz azul.	86
Figura 18. Contenido de humedad máximo durante las cuatro etapas principales del proceso de elaboración de tesgüino.	87
Figura 19. Imágenes obtenidas de maíz (frente) a diferentes tiempos de germinación. Área, diámetro de Feret y dimensión fractal del frente, germen y costado del grano.	89
Figura 20. Imágenes obtenidas de maíz (costado) a diferentes tiempos de germinación.	90
Figura 21. Gráfico de la variación de la magnitud del área del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	90
Figura 22. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	91
Figura 23. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	91
Figura 24. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	92

	PÁGINA
Figura 25. Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	92
Figura 26. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	93
Figura 27. Gráfico de la variación de la magnitud del área del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	93
Figura 28. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	94
Figura 29. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	94
Figura 30. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret promedio del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	95
Figura 31. Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	95
Figura 32. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	96
Figura 33. Gráfico de la variación de la magnitud del área del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	96
Figura 34. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	97
Figura 35. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	97
Figura 36. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret promedio del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	98
Figura 37. Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	98
Figura 38. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.	99
Figura 39. Curva tipo de ácido gálico empleada en la determinación de fenoles totales.	101
Figura 40. Curva tipo de ácido ferúlico empleada en la determinación de fenoles totales.	101
Figura 41. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de germinación de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	102
Figura 42. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de cocción del Lote 1 de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	102
Figura 43. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de cocción del Lote 2 de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	103
Figura 44. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de fermentación para la elaboración de tesgüino de maíz azul.	103

	PÁGINA
Figura 45. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales en las diferentes etapas de preparación de tesgüino de maíz azul.	104
Figura 46. Gráfico de la cantidad de antocianinas extraídas con los diferentes tratamientos especificados en la Tabla 17.	105
Figura 47. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de germinación del maíz azul para la elaboración de tesgüino.	106
Figura 48. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de cocción del Lote 1 del germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	107
Figura 49. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de cocción del Lote 2 del germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	107
Figura 50. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de fermentación para la elaboración de tesgüino de maíz azul.	108
Figura 51. Contenido de antocianinas máximo durante las cuatro etapas principales del proceso de elaboración de tesgüino.	108
Figura 52. Estabilidad del radical DPPH con respecto al pH	109
Figura 53. Estabilidad del radical ABTS ⁺ con respecto al pH	110
Figura 54. Porcentaje de inhibición del radical DPPH ⁺ con respecto a la concentración de TROLOX.	110
Figura 55. Porcentaje de inhibición del radical ABTS ⁺ con respecto a la concentración de TROLOX.	111
Figura 56. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH [•] y ABTS ⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	112
Figura 57. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres DPPH [•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	112
Figura 58. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre ABTS ⁺ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	113
Figura 59. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres (DPPH [•] y ABTS ⁺) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	113
Figura 60. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH [•] y ABTS ⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	114

	PÁGINA
Figura 61. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre DPPH [•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	114
Figura 62. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre ABTS ⁺ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	115
Figura 63. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres (DPPH [•] y ABTS ⁺) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	115
Figura 64. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH [•] y ABTS ⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	116
Figura 65. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre DPPH [•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	116
Figura 66. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre ABTS ⁺ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	117
Figura 67. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres (DPPH [•] y ABTS ⁺) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.	117
Figura 68. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH [•] y ABTS ⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.	118
Figura 69. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre DPPH [•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.	118
Figura 70. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre ABTS ⁺ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.	119
Figura 71. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres (DPPH [•] y ABTS ⁺) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.	119
Figura 72. Actividad antioxidante expresada como % de inhibición del radical libre DPPH [•] en las diferentes etapas de elaboración de tesgüino de maíz azul.	120
Figura 73. Representación de los colores acromáticos (moreno, 2004)	121

	PÁGINA
Figura 74. Variación de la luminosidad de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.	122
Figura 75. Variación del tono de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.	122
Figura 76. Variación de la saturación o croma de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.	123
Figura 77. Variación de la luminosidad de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.	124
Figura 78. Variación del tono o matiz de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.	125
Figura 79. Variación del croma o saturación de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.	125
Figura 80. Variación de la luminosidad del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.	127
Figura 81. Variación del tono o matiz del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.	127
Figura 82. Variación del croma o saturación del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.	128
Figura 83. Diferencias de color evaluadas en las diferentes etapas de elaboración de tesgüino.	128
Figura 84. Cinética de crecimiento de <u>L. plantarum</u> en medio líquido MRS a 36 °C.	130
Figura 85. Cinética de crecimiento (36 °C) de <u>L. plantarum</u> en maíz germinado, molido y cocinado.	130
Figura 86. Cinética de crecimiento (36 °C) de <u>L. plantarum</u> en maíz germinado, molido y cocinado con alimentación de sustrato (maíz germinado 24h más, molido y cocinado).	131
Figura 87. Cinética de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> en medio líquido MY a 32 °C.	132
Figura 88. Cinética de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> (32 °C) en maíz germinado, molido y cocinado.	132
Figura 89. Cinética de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> (32°C) en maíz germinado, molido y cocinado con alimentación de sustrato (maíz germinado 24h más, molido y cocinado).	133
Figura 90. Cinética de crecimiento de <u>L. plantarum</u> durante la fermentación del tesgüino.	133
Figura 91. Cinética de crecimiento de <u>S. cerevisiae</u> durante la fermentación del tesgüino.	134
Figura 92. Variación del pH del medio con respecto al tiempo de fermentación de tesgüino de maíz azul.	134
Figura 93. Cantidad de etanol producido durante la fermentación de tesgüino de maíz azul.	135
Figura 94. Variación de la cantidad de ácido láctico durante la fermentación de tesgüino de maíz azul.	135

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Composición química de diferentes partes del grano de maíz.	5
Tabla 2. Composición química del tesgüino en diferentes etapas de su elaboración.	11
Tabla 3. Diferentes iluminantes definidos por la CIE.	41
Tabla 4. Gráficos de variación a obtener durante el proceso de elaboración de Tesgüino.	55
Tabla 5. Composición de los medios Agar Extracto de Levadura - Extracto de Malta (YM) y Agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS)	60
Tabla 6. Temperatura y humedad (H.R.) ambientales, y temperatura del sustrato al momento de tomar las muestras de las diversas fases de elaboración y fermentación del tesgüino.	61
Tabla 7. Técnicas para la determinación de actividad antioxidante usadas por diversos autores.	65
Tabla 8. Condiciones de experimentación usadas por diversos autores en las técnicas aplicadas en este trabajo.	68
Tabla 9. Reactividad relativa de la enzima ADH con diferentes alcoholes.	73
Tabla 10. Comparación de los valores obtenidos de peso hectolítrico, viabilidad del grano, energía germinativa, capacidad germinativa y humedad de maíz azul y maíz blanco originarios de S.M. Tepopula, Edo. Mex.	77
Tabla 11. Comparación de la composición del grano de maíz usado en este trabajo con algunos otros reportados en la literatura.	79
Tabla 12. Comparación de la cantidad de antocianinas y compuestos fenólicos totales así como la actividad antioxidante de maíz azul y blanco originarios de S.M. Tepopula, Edo. Mex.	80
Tabla 13. Parámetros y niveles tomados en cuenta para determinar las condiciones óptimas de germinación de maíz azul por medio de un diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi.	81
Tabla 14. Serie de experimentos elaborados de acuerdo al diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul.	81
Tabla 15. Resultados obtenidos para el diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul.	82
Tabla 16. Combinaciones de factores obtenidos para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul con un nivel de conveniencia de 1.	82
Tabla 16. Parámetros estadísticos usados para la selección de las semillas empleadas en el análisis de imagen.	88
Tabla 17. Extracción de antocianinas de maíz azul usado en este trabajo con diferentes soluciones extractoras.	105
Tabla 18. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de germinación del maíz azul utilizado en este trabajo.	122
Tabla 19. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de cocción del maíz azul utilizado en este trabajo.	124
Tabla 20. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de fermentación del maíz azul utilizado en este trabajo.	126
Tabla 21. Características fisicoquímicas y sensoriales del Tesgüino de 56h de fermentación.	136

1. INTRODUCCIÓN



Es evidente la tendencia que hoy en día se tiene hacia el consumo de alimentos que aporten a la dieta algo más que los nutrimentos básicos de mantenimiento del organismo, se busca que los alimentos contribuyan a “reparar” los daños producidos por el estilo de vida actual (estrés, consumo de tabaco y bebidas alcohólicas, sedentarismo, etc.). Esta tendencia aunada al surgimiento del movimiento denominado “slow food” (llamado así para denotar su antagonismo con el término “fast food”) han llevado a diversas culturas a promover los beneficios del consumo de alimentos que de forma tradicional han elaborado, esto con la finalidad no solo de rescatar sus costumbres sino de promover el desarrollo económico de sus comunidades y la salud de sus habitantes.

El maíz es la base de la vida rural y, por tanto de la cultura de los mexicanos como eje de la actividad económica, productiva, como base de la alimentación y elemento insustituible del arte culinario así como centro de conocimiento expresado en prácticas cotidianas de preparación (Benz, 1997). De maíz se hacen innumerables alimentos y bebidas, entre estas últimas se encuentran: el tascalate, el achocote, el piznate, el sendecho, el tejuino, el pozol, y el tsegüino o batari (Barros y Buenrostro, 1997), durante la elaboración de estos productos, los constituyentes del maíz cambian, modificando así no solo las características sensoriales y nutricionales del producto sino además el efecto adicional a la salud que pudiera proporcionar con respecto a la materia prima original. La producción de alimentos fermentados, es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antiguas conocidas por el ser humano. Se han descrito métodos de fermentación que datan del año 6000 A.C. y aunque eran llevadas a cabo de forma artesanal y por tanto, no se apreciaba el papel de los microorganismos, daban como productos no solo características sensoriales diferentes y en muchos casos superiores, sino aportes nutricionales que no conlleva el consumo del producto inicial (Caplice y Fitzgerald, 1999).

2. GENERALIDADES

2.1. Cereales.

La importancia de los cereales para la dieta del ser humano e incluso para su historia es invaluable. Contienen entre diez y veinte veces más energía que las frutas y los vegetales más succulentos, son fuente importante de proteínas, carbohidratos, vitaminas del complejo B, vitamina E, hierro, minerales traza y fibra, además sirven de forraje al ganado que es destinado a la alimentación humana, por otro lado pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo en buenas condiciones. Los principales cereales cultivados son el trigo, el arroz, el maíz y la avena (Haard, y col., 1999).

La producción de cereales ocupa cerca del 60% de la producción total de alimentos a nivel mundial, sus granos y productos tales como harinas obtenidas a partir de ellos contienen numerosos compuestos funcionales tales como ácidos grasos, fitoesteroles, almidón resistente y compuestos fenólicos, además, el consumo de granos enteros se ha asociado a las bajas incidencias de ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, en adición a esto, los cereales y sus sub productos han sido probadas como soporte de bacterias ácido lácticas usadas como probióticos, éste hecho sugiere que la fermentación de cereales puede dar como resultado productos con actividades promotoras de la salud (Salmeron y col., 2009).

2.2. Maíz.

El grano de maíz (*Zea mays*) es la principal fuente de la alimentación humana en América; en Europa este lugar lo ocupa el trigo y en Asia el arroz. En el entorno mundial, el maíz como fuente para la alimentación humana, ocupa el segundo lugar, después del trigo. Es el único cereal proveniente del Nuevo Mundo. Su origen y evolución han sido un misterio pues ha llegado a nuestros días altamente evolucionado, sin conocerse formas intermedias (Barros y Buenrostro, 1997).

Existe la idea general de que el maíz es una planta originaria de América, aunque todavía se discute el sitio exacto de domesticación, así como sus antecesores. Algunos autores consideran a México como el sitio donde se originó el maíz, aunque otros aceptan que fue en la región andina de Sudamérica. En cuanto a sus antecesores, se cree que tuvo origen en una planta con vaina cuya especie se originó en América del Sur y floreció probablemente en las estribaciones orientales de los Andes donde se cultivó

hasta el momento actual. De esta planta se originarían variedades que sufrieron mutaciones hasta formar la especie Zea mays L. sin vaina. En América Central y México una de esas variedades conocida también comúnmente con el nombre de “maíz andino” produjo, mediante hibridación con un tipo de Tripsacum, el “teocentli” (Euchlaena mexicana Shtad) y otras formas de maíz (Cruz y Ulloa, 1973).

El cultivo de maíz es el más importante en México, de las 16 millones de hectáreas cultivadas en los últimos 20 años, el 50% correspondió a este cereal. Desde 1993 la producción nacional se ha ubicado alrededor de 18 millones de toneladas; el 70% de la producción nacional se encuentra en 8 entidades federativas: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Puebla y Sinaloa (López, 2004).

Refiriéndose al maíz en la alimentación, José de Acosta, cronista español, anota las variadas formas de consumo del maíz, indicando que los indígenas sudamericanos lo preparaban cocido y era ingerido en forma de sopa, de arepas, de tortillas (tlaxcalli), bollos, pasteles, tamales, en guisados o simplemente el grano tostado y también lo utilizaban en la fabricación de bebidas a las que los nativos del Perú llamaban chicha y sora. Estas bebidas ya eran preparadas antes de la conquista española y formaban parte de las ceremonias, ritos y funerales incas que eran efectuados durante todo el año. El cronista Fernández de Oviedo hace mención a los alimentos de maíz que eran preparados por los indígenas de México y así mismo indica la elaboración de una bebida a base de este cereal hecha por los indios del mar del Sur, la cual era preparada con harina tostada revuelta en agua y, aun cuando el agua oliera mal, le añadían uno o dos puños de maíz (Cruz y Ulloa, 1973). En la actualidad la dieta de la población mexicana sigue siendo dependiente de la tortilla que al complementarse con el frijol producen un complejo nutrimental extraordinario (Paredes y col., 2006). La harina de maíz no es apropiada para la elaboración de pan. El maíz es, sin embargo una fuente significativa de productos industriales que incluyen cereales para desayuno, alimentos ligeros, harina de maíz y jarabe de almidón (Kirk y col., 1996). El maíz presenta el siguiente perfil taxonómico:

Reino	Vegetal	División	Tracheophyta
Subdivisión	Pteropsidae	Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotiledoneae	Grupo	Glumiflora
Orden	Graminales	Familia	Gramineae
Tribu	Maydeae	Género	Zea
Especie	mays		

El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una cariósida y agrícolamente se le conoce como semilla, está formado por las siguientes partes:

Pericarpio:	Cubierta del fruto, se conoce como testa, hollejo o cáscara.
Aleurona:	Capa de células del endospermo, de naturaleza proteica.
Endospermo:	Tejido de reserva de la semilla, que alimenta al embrión durante la germinación.
Escutelo o cotiledón:	Parte del embrión.
Embrión o germen:	Planta en miniatura con la estructura para originar una nueva planta.
Capa terminal:	Parte que se une al olote, con una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad.

2.2.1. Composición química del maíz.

Existe un número considerable de datos sobre la composición química del maíz, en ella influyen la estructura física del grano, factores genéticos y ambientales, la elaboración y otros eslabones de la cadena alimenticia. El maíz es ante todo una fuente de energía, tiene pocas proteínas y vitaminas. En la Tabla 1 se muestra la composición química de las partes principales del grano (Figura 1). Aproximadamente el 90% de las proteínas del endospermo del maíz son prolaminas (llamadas zeinas) y glutelinas. La calidad nutrimental está definida en buena medida por la calidad de sus proteínas y ésta, a su vez, la establece el contenido de los llamados aminoácidos esenciales, tanto la zeina como la glutelina del maíz son deficientes en lisina y triptófano, de hecho la zeina no contiene este aminoácido, por otro lado, la proteína del maíz es rica en leucina pero muy deficiente en isoleucina. Este desbalance, provoca que el valor biológico de la proteína disminuya (Paredes y col., 2006). En cuanto a los minerales, éstos están concentrados en el embrión (tres cuartas partes), distribuyéndose el resto en el endospermo exterior. El maíz es pobre en calcio pero sumamente rico en fósforo y potasio. Su contenido de magnesio y sodio es bajo; en cambio, se encuentran en el grano importantes cantidades de hierro (Cruz y Ulloa, 1973). El valor nutricional de este cereal se afecta en forma importante por los métodos culinarios empleados en su preparación (Kirk y col., 1996)

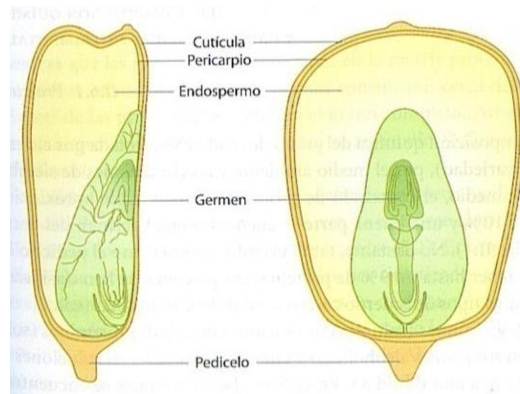


Figura 1. Principales partes estructurales del grano de maíz (Paredes y col., 2006)

Tabla 1. Composición química de diferentes partes del grano de maíz.

Componente químico	Grano completo	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas (%)	10.3	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo (%)	4.8	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda (%)	---	86.7	2.7	8.8
Cenizas (%)	1.4	0.8	0.3	10.5
Almidón (%)	71.5	7.3	87.6	8.3
Azúcar (%)	2.0	0.34	0.62	10.8
Calcio (mg/100g)	12	---	---	---
Fierro (mg/100g)	5.0	---	---	---
Vitamina B1 (mg/100g)	0.33	---	---	---
Ácido Nicotínico (mg/100g)	1.5	---	---	---
Riboflavina (mg/100g)	0.13	---	---	---
Energía (MJ/100g)	1.19	---	---	---
Aminoácido limitante	Triptófano Lisina	---	---	---

(FAO, 1993) (Paredes y col., 2006) (Kirk y col. 1996)

La composición química del endospermo configura distintas formas del grano y características físicas, que permiten establecer tipos estructurales bastantes claros que son:

Maíz dentado (*Zea mays indentata*). Se caracteriza por una depresión o diente en la corona del grano, que se origina por la contracción del endospermo harinoso a medida que el grano va secándose.

Maíz cristalino (*Zea mays indurata*). Contiene una gruesa capa de endospermo cristalino, que cubre un pequeño centro harinoso.

Maíz harinoso (Zea mays amilaceo). Tiene un endospermo harinoso, sin endospermo cristalino.

Maíz dulce (Zea mays saccharata). En este tipo de maíz, la conversión del azúcar en almidón es retardada durante el desarrollo del endospermo.

Maíz palomero (Zea mays everta). Se caracteriza por un endospermo cristalino muy duro, solamente posee una pequeña porción de endospermo harinoso, tiene la característica de expandirse al someterse al calor.

Maíz tunicado (Zea mays tunicata). Cada grano está encerrado en una vaina o túnica. Se usa como ornamento o como fuente de germoplasma en los programas de fitomejoramiento (López, 2004).

Los maíces pigmentados, están presentes en la mayoría de las 41 razas de maíz descritas en México, los colores negros, morados y rojos que se observan, se deben a las antocianinas, compuestos presentes en el pericarpio, en la capa aleurona, o en ambos. En la región Central de México el consumo de tortillas de maíz azul ocurre en comunidades y pueblos, durante festejos especiales. (Salinas y col., 2003).

2.3. Cereales fermentados.

Los tejidos animales o vegetales sujetos a la acción de los microorganismos o enzimas para obtener cambios bioquímicos deseables y modificaciones en la calidad de los alimentos, se denominan alimentos fermentados. La fermentación es la forma más antigua de la biotecnología de alimentos como ejemplo, la elaboración de cerveza data de hace 5000 años.

Los objetivos de fermentar alimentos son: enriquecer la dieta a través del desarrollo de una diversidad de sabores, aromas y texturas; conservar los alimentos a través de la producción de ácido láctico, acético y alcohol; enriquecerlos con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas; destoxificarlos y disminuir los tiempos de cocción y requerimientos de combustible. En los países en vías de desarrollo en que es necesario conservar grandes cantidades de alimentos y enriquecerlos ya que los recursos son bajos, se han mantenido las técnicas tradicionales de fermentación de alimentos. Los cereales son sustratos importantes para la fermentación (Haard, y col. 1999).

De maíz se hacen decenas de bebidas, muchas de las cuales proporcionan refresco y nutrimentos para el trabajo del campo, sobre todo en los climas tropicales: el tascalate chiapaneco de cacao, maíz o

tortilla tostada, achiote y canela, el achocote hidalguense, el popo veracruzano, de Nayarit es el piznate, el sendecho de maíz germinado de Michoacán y la zona mazahua, el tejuino de Colima, Nayarit y Sonora, de Jalisco, el pozol y el chorote tabasqueños, la tanchuera es yucateca y, entre los tarahumaras, el tesgüino o batari, hecho de maíz germinado, cocido y molido y después fermentado en ollas de barro (Barros y Buenrostro, 1997).

En México, la elaboración de cerveza se inició durante la colonia, García y col. (2005) hacen mención del Tesgüino como el primer antecedente de cerveza en México, el cuál data de la época prehispánica. El pozol y el tesgüino son las bebidas obtenidas a partir de la fermentación de este cereal con mayor trascendencia.

2.4. Tesgüino.

García y col. (2005) Definen al tesgüino como una “bebida semejante a cerveza preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con catalizadores, que son fragmentos de plantas existentes en la región donde se elabora”.

El tesgüino es una bebida consumida en las comunidades indígenas (Yaquis y Pimas en Sonora, Tarahumaras en Chihuahua, Guarijíos en Chihuahua y Sonora, Tepehuanos en Durango, Huicholes en Jalisco y Nayarit y Zapotecos en Oaxaca) y por la población mestiza de varios estados del norte y noroeste de México (Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco y Oaxaca) (Ulloa y col., 1987) El nombre tesgüino proviene del náhuatl “tecuin” y quiere decir “palpitar el corazón”. Aparentemente, el nombre más correcto asignado por los tarahumaras para denominar al tesgüino es el término “sugiki”, aunque también es usado el de batari. El uso de estos términos se explica fácilmente ya que son los ingredientes de la bebida, el primero es el elote del maíz y el segundo es el nombre de las cortezas que son usadas como “catalizadores” (Cruz y Ulloa, 1973).

Los tarahumaras, o rarámuris (que etimológicamente significa “planta [del pie] corredora”) como ellos se denominan son un grupo aborigen que habita en la zona sur occidental del Estado de Chihuahua. Su población de aproximadamente 50 000 individuos está dispersa en un territorio de unos 50 000 Km² ocupando tanto la región montañosa como la barranqueña de la Sierra Tarahumara. Debido a la difícil topografía del terreno, el patrón de asentamiento que predomina es el de pequeñas rancherías aisladas, localizadas en los espacios de tierra disponibles para la agricultura. En este tipo de

organización social la unidad básica la constituye la familia, que se encarga de realizar todas las labores cotidianas y que trata de ser autosuficiente. La comunidad funcional de la unidad familiar la constituyen las rancherías de los alrededores con las que se relacionan mediante el trabajo cooperativo recíproco y en participaciones conjuntas en festividades religiosas y deportivas. En todos estos eventos, así como en las reuniones políticas, el tesgüino está presente, desempeñando un papel importante a nivel social por que actúa como elemento de cohesión de la comunidad (Lappe y Ulloa, 1989).

Entre los pueblos indígenas el tesgüino tiene un importante uso ceremonial, puesto que se consume en celebraciones religiosas, en funerales y durante sus juegos deportivos. Durante todo el año, los tarahumaras llevan a cabo tesgüinadas, teniendo estas fundamentalmente una función económica pues representan una forma de pago al trabajo comunitario; son tan importantes en la vida del tarahumara como los festivales de tipo religioso. En estas reuniones de tipo no familiar se llevan a cabo trabajos como la edificación de casas o corrales. Los huicholes, grupo indígena de la Sierra Madre Occidental, quienes basan su vida en la producción y consumo de maíz (Neurath, 2006), hacen una procesión de culto al sol en el mes de diciembre, donde cada uno lleva una caña de maíz fructificada; se sientan en torno a una hoguera hecha con caña de maíz y el sacerdote canta y reza; cuando ha terminado, deposita ante el altar el tesgüino, chocolate, monedas y mazorcas, en esta fiesta el tesgüino que se le deja a la reina del maíz es llamado Jarianaka (Cruz y Ulloa, 1973). Diluida con agua esta bebida es ingerida por lactantes y niños, y constituyendo un complemento importante de su dieta (Paredes y col., 2006).

Se desconoce la fecha precisa a partir de la cual los tarahumaras comenzaron a elaborar esta cerveza. Sin embargo, según la relación de Guaguachic de 1777, durante la estancia de los jesuitas y franciscanos (siglo XVIII) en la región tarahumara, dicha bebida era preparada y consumida frecuentemente. El proceso de elaboración actual de esta cerveza varía de una región y época del año a otra, utilizándose diversas plantas como materias primas por lo que puede considerarse existen varias modalidades de tesgüino, con diferentes nombres (Lappe y Ulloa, 1989). También es conocido como tecuín o tecuino y es una bebida fermentada (cerveza) opaca, de consistencia espesa hecha de maíz, agua y piloncillo. Se puede preparar con granos de maíz, con jugo de cañas de maíz, con frutas como las bayas de madroño, duraznos, granos de trigo, granos de sorgo o jugo de hojas de maguey. El

más común, sin embargo, es el tesgüino que se hace con granos de maíz germinados (Cruz y Ulloa, 1973).

Se prepara tradicionalmente haciendo germinar los granos de maíz en canastas hechas para este fin, a oscuras, para que los brotes no reverdezcan, pues amargan la bebida, así se transforman en azúcares los almidones, posteriormente se muele, se hierve, se cuela con canastos y se pone a fermentar con un catalizador, ya sea frijolillo, flor de manzanilla o de durazno, la hierba seréke, la del piquete o semillas de madroño en una olla exclusiva para su elaboración denominada “olla tesgüinera” (la Figura 2 muestra el proceso de elaboración tradicional de Tesgüino). En las regiones cercanas al río Conchos en Chihuahua los tarahumaras añaden al tesgüino alcaloides alucinógenos como el peyote en vez de catalizadores, provocando un efecto más placentero en el consumidor (Ulloa y col., 1987). Además cuando se usa este cactus, da resistencia contra la fatiga y calma el hambre y la sed, hace entrar al individuo a un mundo de fantasías, que lo hace sentir la facultad de predecir el porvenir, su empleo entre los indígenas no se debe a hábito, sino que obedece a ritos religiosos. El principio activo del peyote (Anhalonium williamsi) es el alcaloide llamado mescalina. Otras variantes incluyen la adición de limón, sal o nieve (Wacher, 2005).

La población mestiza de las regiones mencionadas, bebe una modalidad de tesgüino de contenido alcohólico más bajo llamado tejuino, lo preparan a partir de granos de maíz germinados que muelen y mezclan con azúcar y piloncillo, no agregan liga o catalizador. Lo consumen como bebida refrescante. Varias cepas de bacterias, levaduras y hongos han sido aisladas del tesgüino, estas incluyen a Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Sacharomyces, Candida, Cryptococcus, Hansenula, Brettanomyces, Pichia, Geotrichum y Penicillium (Ulloa y col., 1987).

Destaca por su importancia Saccharomyces que participa en la fermentación alcohólica del tesgüino, el inóculo se encuentra en la superficie de utensilios y ollas “tesgüineras”. Bacillus megaterium también ha sido aislado de varias muestras, ya que no hay una metodología estandarizada para la elaboración, del tesgüino su microflora varía de acuerdo a su preparación, al sustrato y el catalizador utilizados.

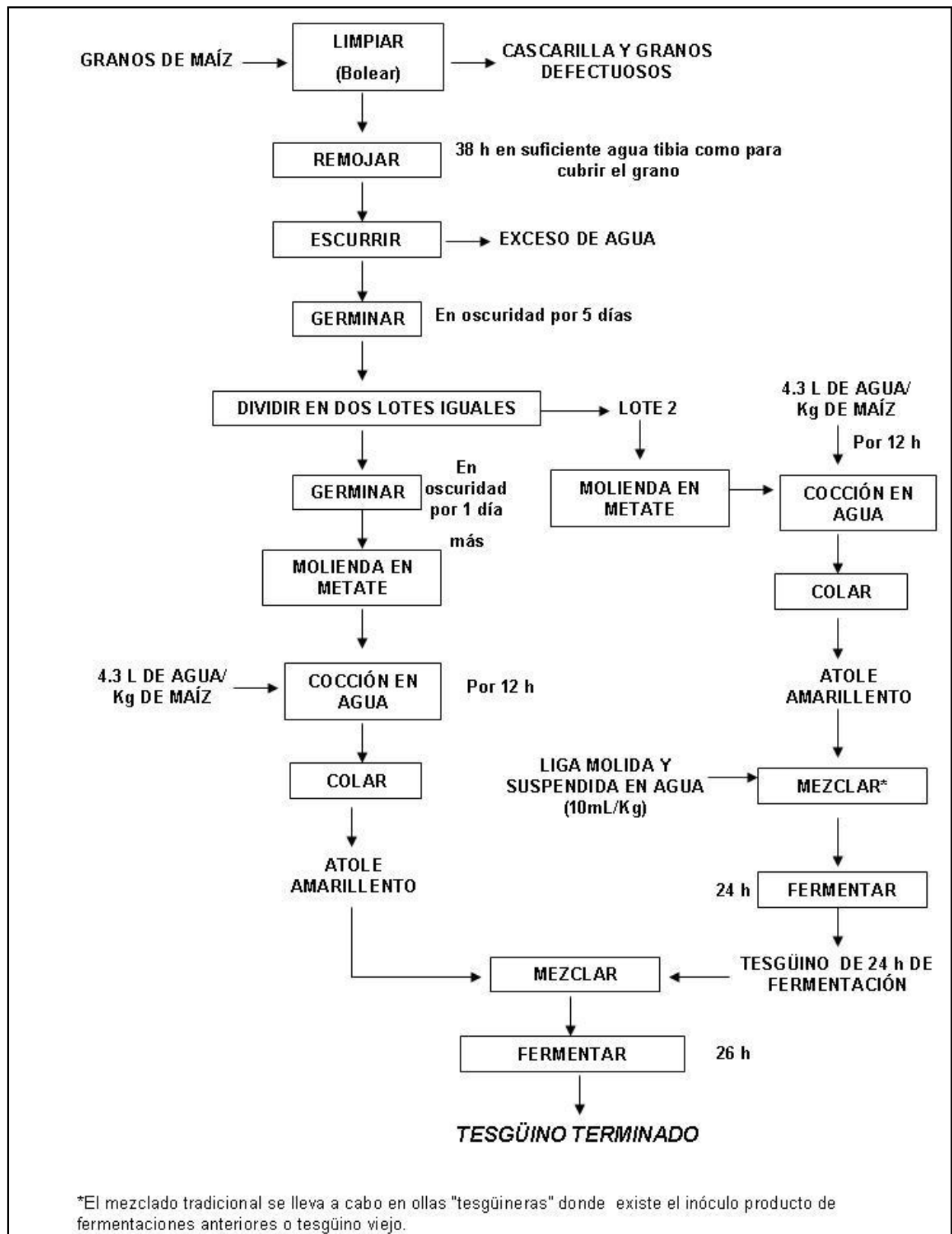


Figura 2. Diagrama de elaboración tradicional de tesgüino elaborado con base en lo reportado por Lappe y Ulloa. (1987)

Los microorganismos detectados después de la cocción, filtrado y enfriado son bacterias homo y heterolácticas. Estos microorganismos producen ácidos láctico y acético los que dan al tesgüino su característico sabor ligeramente ácido y refrescante. Se han aislado abundantes especies de levaduras productoras de etanol entre las que destacan Candida guilliermondii, Hansenula anomala, S. cerevisiae, y S. kluyvery; otras levaduras producen ésteres los cuales contribuyen a la turbidez, aroma y sabor. La producción del Tesgüino es una fermentación alcohólico-láctica, seguida de otra alcohólico-acética (Paredes y col., 2006).

Se ha especulado mucho acerca del uso de la liga o catalizador, se tiene la hipótesis de que puede servir como fuente de vitaminas, enzimas y otros factores de crecimiento que promueven la fermentación (Haard y col., 1999).

Los datos de la Tabla 2 presentados por Lappe y Ulloa (1989), aparentemente no muestran cambios significativos positivos en cuanto al contenido de proteína, sin embargo hay que notar que los valores se dan en base húmeda y la humedad aumenta más del 7% por lo que quizá al hacer el cálculo en base seca, se obtendrían resultados similares a lo reportado por Paredes y col. 2006 quienes mencionan que el valor nutricional del tesgüino es superior al de las materias primas utilizadas en su elaboración en virtud de los incrementos en el contenido de proteína y ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico.

Tabla 2. Composición química del tesgüino en diferentes etapas de su elaboración.

Muestra	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Proteína (Nx6.25)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Niacina mg/100mL
Suspensión de maíz germinado y cocido	83.8	16.2	1.66	0.23	0.75	0.76
Atole cocido y colado	81.0	19.0	1.40	0.27	0.61	0.43
Tesgüino de 24 h de fermentación.	87.6	14.2	1.18	0.22	0.29	0.24
Tesgüino de 36 h de fermentación.	89.8	10.2	1.10	0.16	0.69	0.35
Tesgüino de 50 h de fermentación.	90.4	9.60	1.27	0.15	0.41	0.30

Todos los valores corresponden a porcentajes en relación a base húmeda (g/100 mL muestra) (Lappe y Ulloa, 1989)

Dentro de las variantes en la elaboración de tesgüino se encuentra el uso de sustratos diferentes de maíz germinado. En ocasiones se usa jugo de tallos de maíz o jugo de hojas de varias especies de magueyes. Los tepehuanos utilizan maíz, sorgo o trigo y añaden catalizadores diferentes a los utilizados por los tarahumaras, pero un procedimiento de elaboración similar lo llaman navaitai (Wacher , 2005).

2.5. Lactobacillus plantarum

Las bacterias ácido lácticas presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico, dada su presencia en multitud de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características sensoriales y reológicas de los alimentos, sino que generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento, en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto posteriormente. Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha podido comprobar que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género Lactobacillus, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal (probióticos). Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros (Samaniego y Sosa, 2000).

Las bacterias lácticas pueden ser utilizadas en la prevención y el control de determinadas enfermedades, así como en el mejoramiento de la calidad de conservación de ciertos alimentos, por lo que su valor radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos que sirvan como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal (Samaniego y Sosa, 2000).

Las bacterias del género Lactobacillus son microorganismos benéficos de particular interés debido a su larga historia de uso, se encuentran entre los primeros microorganismos usados por el ser humano para el procesamiento de comestibles.

El género Lactobacillus está comprendido por cerca de 140 especies e incluye bacterias gram positivas, catalasa negativas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas y que se desarrollan en condiciones que van de microaerófilas hasta anaerobias estrictas (Wang, 2009; Singh, 2009). Los lactobacilos son usualmente bacilos delgados, cortos o largos aunque también pueden llegar a tener formas de espiral o cocobacilos bajo ciertas condiciones. Son genéticamente muy diversos, con contenidos G+C que van desde 32% para L. multi hasta 54% para L. fermentum (Singh, 2009). Son estrictamente fermentativos, acidúricos o acidófilos y tienen requerimientos nutrimentales muy complejos (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas). Al desarrollarse en glucosa como fuente de carbono, pueden ser homofermentativos (producen más de 85% de ácido láctico) o heterofermentativos (produciendo ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares) (Bernardeau, 2006)

En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology de 1986, tomando en cuenta el incremento en el número de especies, reorganiza la nomenclatura de los lactobacilos en tres grupos: I Homofermentativos obligados, II Heterofermentativos facultativos y III Heterofermentativos obligados. Esta nomenclatura basada en características fenotípicas es comúnmente aceptada. Existe otra nomenclatura basada en características filogenéticas que también comprende tres grupos: el grupo de L. delbrueckii, el de L. casei/Pediococcus y el grupo de Leuconostoc. Sin embargo, constantemente se describen nuevas especies de Lactobacillus (por ejemplo, en 2005 se tuvieron 12 nuevas especies). Además algunas especies han sido cambiadas de nombre como Lactobacillus bavaricus que ahora se nombra Lactobacillus sakei; algunas otras han sido reclasificados en otros nuevos géneros, por ejemplo, L. carnis, L. divergens, L. maltaromicus y L. pscicola han sido reclasificados como especies de Carnobacterium. Este proceso de cambio taxonómico es continuo y ha cambiado de 44 especies y 11 sub especies descritos en 1986 a 88 y 15 respectivamente en 2003, 125 y 27 en 2005 (Bernardeau, 2006) hasta 160 y 27 en Mayo de 2009 (Euzéby, 2009).

El estudio de datos obtenidos de experimentos moleculares, metabólicos y paleontológicos, sugiere que las bacterias ácido lácticas incluyendo a los lactobacilos pudieron haber surgido hace 3 billones de años aproximadamente y su población se expandió rápidamente con el surgimiento de los mamíferos hace 65 millones de años. Los lactobacilos son omnipresentes, se encuentran donde sea que haya

substancias ricas en carbohidratos, están asociados de forma cercana con animales marinos y terrestres, su medio ambiente y su alimento. Colonizan varios hábitats en el cuerpo de animales y seres humanos sanos tales como membranas mucosas de la cavidad oral, intestino y vagina. Además están presentes en alimentos fermentados (lácteos, cárnicos y vegetales), aguas residuales y alimentos contaminados o en estado de putrefacción (Bernardeau, 2006).

Las colonias de Lactobacillus en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6.0. Los lactobacilos no licuan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni ácido sulfídrico (H_2S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción benzidina-negativa. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H_2S) y aminas en el queso (Bergey, 1992).

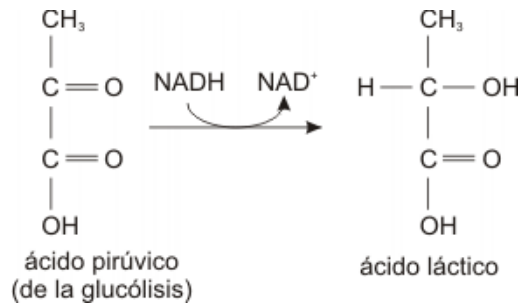
Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos: los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimuladora y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS (Samaniego y Sosa, 2000)

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4 – 4.5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 1992).

La mayoría de las cepas de Lactobacillus son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, 1992).

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40 °C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos pueden crecer a temperaturas cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55 °C y no crecen por debajo de 15 °C. Aún no se conocen los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55 °C (Bergey, 1992).

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado (Kandler, 1983). Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por fermentación homoláctica y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica.



Los lactobacilos son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de los lactobacilos intestinales ante antibióticos empleados como aditivos para alimentos (Bergey, 1992).

Aparte de las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por L. casei subsp. rhamnosus, L. acidophilus, L. plantarum y ocasionalmente L. salivarius (Bernardeau, 2006). Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen.

Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas (Venema y col., 1996). También pueden encontrarse en habitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico.

Lyons (1997) ha denominado probióticos a los productos naturales que son utilizados como promotores del crecimiento en los animales, de tal manera que su empleo permita obtener mayores rendimientos, elevada resistencia inmunológica, reducida o ninguna cantidad de patógenos en el tracto gastrointestinal y menores residuos de antibióticos u otras sustancias. L. plantarum es un probiótico único, dada su capacidad para tolerar valores de pH más bajos que la mayoría de otros microorganismos (Mc Donald y col., 1990), razón por la cual esta especie se presenta comúnmente en alimentos fermentados naturalmente, en vegetales, en pescados y en carnes.

Entre la variedad de sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias ácido-lácticas se encuentran las bacteriocinas, proteínas bactericidas que inhiben especies estrechamente relacionadas con el cultivo productor (Klaenhammer, 1988).

Se han aislado y caracterizado parcialmente muchas bacteriocinas de Lactobacillus plantarum; sin embargo, solamente tres se han purificado y secuenciado: Plantaricina A, Plantaricin C y Plantaricina

149 (De Vuyst, 1994). L. plantarum es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo los patógenos (Olesupo y col., 1995).

Las bacterias ácido lácticas preservan los alimentos como resultado de un crecimiento competitivo producto de su metabolismo y de la producción de bacteriocinas. Es por esto que desempeñan un papel importante en las fermentaciones de alimentos, pues ocasionan los cambios de sabores característicos y ejercen un efecto conservador sobre los productos fermentados. Se estima que el 25% de la dieta de los europeos y el 60% de la dieta en muchos países subdesarrollados consiste en alimentos fermentados (Holzapfel y col., 1995). Entre las especies de Lactobacillus que desempeñan un papel interesante en la bioconservación se encuentra L. plantarum, bacteria que contiene plásmidos proclives a portar genes de importantes enzimas de la fermentación (Nes, 1984). L. plantarum no sólo preserva adecuadamente, sino que también, algunas veces, incrementa el contenido de importantes nutrientes como los ácidos grasos Ω -3, bajo condiciones de almacenamiento (Peng, 1975). Su habilidad exclusiva para inhibir patógenos es utilizada por la industria alimentaria para la bioconservación. Al respecto, se ha comprobado que cuando se inocula en alimentos en conservación inhibe completamente el crecimiento de bacterias aeróbicas, algunas enterobacteriáceas y Staphylococcus aureus (Ashenafi y Busse, 1989).

Con respecto a otros efectos relacionados con el mejoramiento de la salud humana, los tratamientos con Lactobacillus se han recomendado para un gran número de condiciones tales como: intolerancia a la lactosa, desórdenes diarreicos, reducción del colesterol, profilaxis de infecciones intestinales y urinarias, inmunomodulación y hasta vacunación oral (Sanders, 1994; Mukai y Arihara, 1994).

2.6. Saccharomyces cerevisiae

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género Saccharomyces son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas, y que a su vez ha inspirado un sinnúmero de obras de

arte que ensalzan al Dios del vino y a aquellos que disfrutaban su consumo. Desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular (Dujon, 1996).

Son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo de los Ascomycetos, es decir, al grupo de hongos capaces de formar esporas contenidas en el interior de un asca. Se hallan diseminadas por toda la naturaleza. Vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy variadas. Las hay elípticas (con forma de huevo) como las especies del género Saccharomyces; esféricas como Torula; alargadas como Torulopsis stellata y apiculadas (con forma de limón) como Hanseniaspora (Peynaud, 1989); se pueden encontrar en agrupaciones de dos, cadenas cortas o racimos o bien sin agruparse, pueden formar o no pseudomicelio; La apariencia de las colonias es muy diversa: de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas, brillantes u opacas (García y col., 2005). Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas (Barnett y col., 1990; De Rosa, 1997).

Las células de S. cerevisiae esporulan formando de una a cuatro ascosporas de forma redonda a ligeramente elipsoidal, fermentan y asimilan la glucosa y normalmente también la sacarosa, maltosa y galactosa, no así la lactosa. No pueden usar como fuente de nitrógeno el nitrato.

La capacidad de crecer en medios libres de vitaminas es variable, lo cual implica que algunas cepas presentan auxotrofias y otras no; sin embargo, aún cuando no existan requerimientos absolutos por ellas, las vitaminas en el medio estimulan el crecimiento e incrementan la productividad.

Desde el punto de vista funcional algunas características generales importantes en las cepas de levadura son: capacidad de flocular, capacidad para producir alcohol, tolerancia al alcohol, tolerancia a la osmolaridad del medio, tolerancia a altas temperaturas y capacidad y vigor en la fermentación de azúcares (García y col., 2005).

Su reproducción puede ser vegetativa (asexual) por gemación generalmente o por escisión. Cuando las condiciones son adversas la mayor parte de las levaduras pueden reproducirse sexualmente generando ascosporas.

Entre las diversas características bioquímicas utilizadas en la clasificación de las levaduras podemos mencionar (Quesada y Cenis, 1995; Suárez, 1997):

- a. El tipo de azúcares que pueden fermentar.
- b. El rendimiento en alcohol, las hay que para producir 1 grado de alcohol consumen de 17 a 18 g de azúcar, otras en cambio con menor rendimiento metabolizan de 21 a 22 g.
- c. Su poder alcohológeno, o grado máximo de alcohol que pueden alcanzar, algunas detienen su actividad a los 5% Vol mientras que otras llegan a 17 o 18% Vol.
- d. Productos secundarios de la fermentación.
- e. Resistencia al anhídrido sulfuroso.
- f. Capacidad para asimilar diferentes sustancias nitrogenadas.

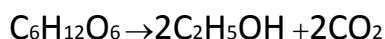
Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos, la Ascomycotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representada por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas por ello asporógenas o no esporógenas. Los géneros de levaduras esporógenas, englobados todos ellos en la familia Saccharomycetaceae, se distribuyen en 3 subfamilias. Los de las levaduras no esporógenas constituyen la familia Cryptococcaceae. Por debajo de los taxones género y especie las levaduras pueden ser clasificadas en subespecies y variedades que a menudo adquieren el rango de especies tras nuevas revisiones taxonómicas, o por el contrario, varias especies son unificadas en una sola como subespecies de la misma con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias (Mesas y Alegre, 1999).

Entre las levaduras esporógenas denominadas frecuentemente de segunda fase por aparecer en un estado avanzado de la fermentación alcohólica y producir gran cantidad de etanol destaca Saccharomyces cerevisiae (S. ellipsoideus) que es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcohológeno es elevado (17°) y es bastante resistente al SO₂ (250 mg/L) (Mesas y Alegre, 1999).

Dentro del género Saccharomyces, la especie cerevisiae constituye la levadura y el microorganismo eucariote más estudiado. Este organismo se conoce también como la levadura de panadería, ya que es necesario agregarla a la masa que se utiliza para preparar el pan para que este esponje o levante; de hecho el término levadura proviene del latín *levare*, que significa levantar.

Tradicionalmente varios géneros de Saccharomyces han estado relacionadas con la producción de bebidas alcohólicas, dentro de las que destacan S. cerevisiae, S. uvarum, S. bayanus, S. oviformis y S. sake por mencionar algunas (García y col., 2005)

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación (Vázquez y Dacosta, 2007):



En condiciones de aerobiosis las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto ya que se consigue 1 g de levadura por cada 4 g de azúcares consumidos. En anaerobiosis las levaduras realizan la fermentación alcohólica, es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO₂ y energía. En estas condiciones el rendimiento en biomasa es de tan sólo 1 g de levadura por cada 100 g de azúcares consumidos.

La secuencia de reacciones enzimáticas por las que las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO₂ se indican en la Figura 3.

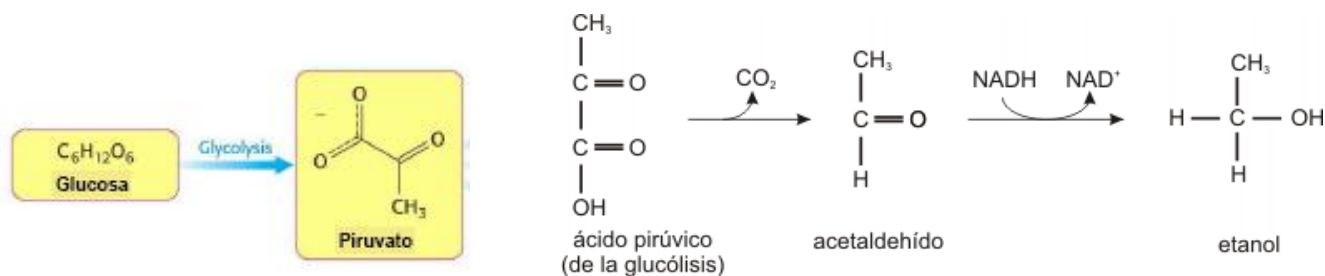


Figura 3. Secuencia de reacciones de la fermentación alcohólica.

Durante la fermentación alcohólica además de etanol y CO₂ se produce cierta cantidad de otros compuestos, que en gran medida contribuyen al sabor y aroma final del vino (Peynaud, 1989; Suárez, 1997). Los más significativos son los siguientes:

A. Glicerol. Cuantitativamente es el segundo componente mayoritario del vino después del etanol. Se encuentra en cantidades de 6 a 10 g/L.

B. Acetaldehído. Aparece durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del ácido pirúvico, aunque también puede proceder de la oxidación del etanol.

C. Ácido acético. Componente mayoritario de la acidez volátil se produce por la condensación de 2 moléculas de acetaldehído, aunque puede tener otros orígenes no relacionados con la FA.

D. Ácido succínico. Responsable del típico sabor entre salado y amargo que caracteriza a las bebidas fermentadas. Procede de la carboxilación del ácido pirúvico y posteriores reacciones redox.

E. Ácido láctico. Procede de la hidrogenación del pirúvico, aunque puede tener su origen en intervenciones bacterianas.

F. Acetoína, diacetilo y 2-3 butanodiol. Son los metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico. Tienen su origen en la condensación y descarboxilación de 2 moléculas de ácido pirúvico.

G. Otros compuestos. Con origen en los azúcares se forman diversos ácidos cuantitativamente minoritarios como cítrico, propiónico, fumárico y fórmico. Con origen en las sustancias nitrogenadas se forman alcoholes superiores como isoamílico e isopropílico que proceden de la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos. Por combinación entre ácidos y alcoholes se generan ésteres.

Existen diversos factores tanto físicos como químicos que inciden positiva o negativamente en el transcurso de la FA, ya sea actuando sobre el desarrollo de las levaduras, ya sea incidiendo directamente sobre la propia FA (Mesas y Alegre, 1999). Los más relevantes son los siguientes:

Temperatura. A mayor temperatura la FA transcurre más rápidamente, sin embargo es menos pura. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios. Por otro lado las levaduras tienen en los 30 °C su temperatura óptima de desarrollo. Por encima de los 35 °C la actividad decrece rápidamente y en torno a los 45 °C mueren. Por debajo de 10 °C la mayor parte de las levaduras silvestres son inactivas.

Oxígeno. Aunque la FA es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado a moléculas del sustrato.

Nutrientos. Por un lado están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la FA transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que deben encontrarse en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras.

Los compuestos químicos de acción negativa. Por un lado la acumulación de los propios productos de la FA pueden ralentizarla. Por otro lado, esos mismos compuestos junto a otros presentes en el sustrato de forma natural (taninos) o artificial (pesticidas, SO₂, etc.) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras.

2.7. Germinación.

El remojo en agua por toda la noche seguido de la germinación de los granos, es una práctica muy común, especialmente para el procesamiento de semillas secas. Durante la germinación, se activan varios sistemas enzimáticos provocando profundos cambios en el valor nutritivo de las semillas (Mohd, y col., 1980). Por ejemplo, el contenido de vitamina C que es muy bajo en las leguminosas, aumenta significativamente durante la germinación mientras que los fitatos disminuyen (Deosthale, 2003).

Cuando se humedece una semilla, ésta absorbe agua y se inician en ella las actividades metabólicas como la respiración y la síntesis de proteínas; después de cierto tiempo el embrión emerge de la semilla. En este momento se dice que la semilla ha germinado. Para que el proceso de germinación se lleve a cabo con éxito, es necesario que exista humedad, oxígeno y una temperatura adecuada. Una vez que la semilla ha germinado, el crecimiento continúa y las reservas de los cotiledones o del endospermo son transportadas hasta las partes nuevas de la plántula, cuyas células están reproduciéndose y elongándose activamente.

El primer paso para que se inicie la germinación es que la semilla entre en contacto con el agua. Ésta es fundamental para que la semilla se rehidrate y exista un medio acuoso donde los procesos enzimáticos puedan llevarse a cabo. La semilla requiere de una pequeña cantidad de agua para rehidratarse, generalmente no más de 2 a 3 veces su peso seco. Son dos los factores que deben tomarse en cuenta al analizar el proceso de absorción (llamado imbibición) de agua por parte de la semilla: 1) las relaciones de la semilla con el agua, y 2) la relación entre la semilla y el sustrato.

La cantidad de agua que absorbe y la velocidad con que lo hace están determinadas por procesos físicos de difusión y por las propiedades de los coloides. El agua tiene que atravesar una membrana permeable, la cual presenta una alta concentración de sustancias en uno de los lados. Las moléculas del disolvente penetran a la sustancia que se está hinchando o embebiendo, ocupando los espacios capilares e intermicelares del coloide. Esto produce una presión de imbibición, de fuerza considerable, la cual llega a alcanzar valores de cientos de atmósferas. Esta presión puede llevar al rompimiento de la

testa durante la germinación. En las semillas, el principal componente que se embebe de agua son las proteínas; también participan otros compuestos como los mucílagos y la celulosa (Moreno, 1996). La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente y se muestran en la Figura 4.

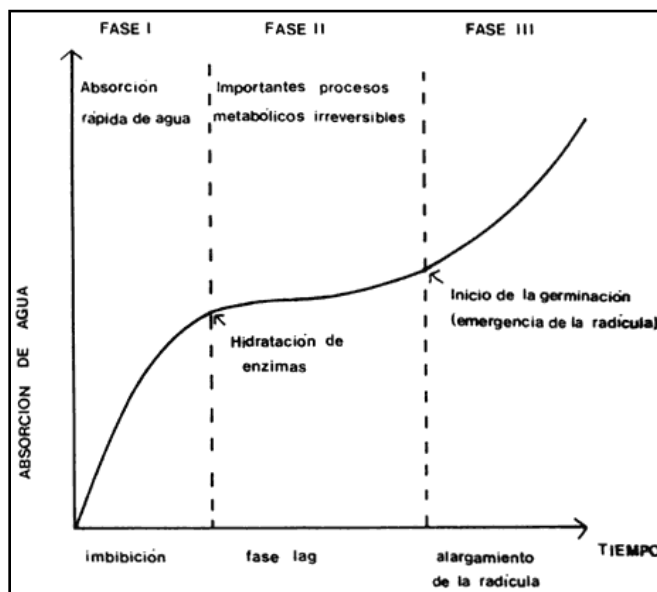


Figura 4. Etapas de la germinación de una semilla. (Vázquez y col., 1997)

Mientras mayor es el contacto, más cantidad de agua puede ser absorbida. La imbibición de las semillas se determina también en función de su morfología. En algunas especies, la entrada principal de agua es por el micrópilo (zona donde la testa es más delgada), más que por toda la superficie de la testa (Vicia y Phaseolus). En algunas semillas de testa dura e impermeable, mientras no se perfora la testa el agua no puede penetrar en algunas de las leguminosas es necesario remover una protuberancia que funciona como una especie de tapón, llamada estrofiolo (Melilotus alba, Crotalaria egyptica) (Moreno, 1996). La cantidad de agua que absorbe una semilla y la velocidad a la que lo hace no sólo dependen de las características de la semilla, como la permeabilidad de sus cubiertas, la composición química de sus reservas, su tamaño y su contenido de humedad, sino que también están determinadas por condiciones ambientales como la humedad del suelo, la humedad del aire y la temperatura (Vázquez y col., 1997).

Las semillas de diferentes especies germinan bajo diferentes rangos de temperatura, a excepción de temperaturas extremas. La sensibilidad de las especies difiere y no necesariamente a una mayor

temperatura corresponde un incremento en la germinación. Las semillas de cada especie pueden germinar dentro de un intervalo de temperaturas; sin embargo existe un punto óptimo, arriba o por debajo del cual la germinación también se lleva a cabo pero más lentamente. Así, la temperatura óptima es aquella bajo la cual se obtiene el porcentaje más alto de germinación en el menor tiempo. La temperatura y el rango en el cual las semillas germinan, está en función del origen de las semillas, de sus características genéticas y de su edad, en el caso del maíz, se reportan temperaturas óptimas de germinación entre 32 y 35 °C.

Existen semillas que sólo germinan en la oscuridad, aquellas que sólo germinan bajo luz continua, otras que requieren de un periodo breve de iluminación para germinar y otras más que son indiferentes a la presencia de luz u oscuridad (Moreno, 1996).

El maíz, ha sido usado desde tiempos muy antiguos en la elaboración de cerveza tipo “lager”, sin embargo, por su uso para elaboración de hojuelas, harinas y otros productos, ha sido desplazado por otros cereales tales como el sorgo a pesar de que al maltearlo se convierte en una fuente rica en enzimas hidrolíticas necesarias para la fabricación de cerveza (Eneje y col., 2004).

2.8. Antioxidantes.

El alto consumo de frutas y vegetales está asociado a la reducción del riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cardíacas y arterioesclerosis, así como enfermedades neurodegenerativas e inflamación (Al-Farsi y col., 2005).

La oxidación de los lípidos ocurre cuando el oxígeno reacciona con estos en series de reacciones en cadena de radicales libres que originan complejos cambios químicos. En los alimentos esta oxidación causa pérdidas en calidad. In vivo, la oxidación lipídica podría jugar un papel importante en las enfermedades cardíacas, la arterioesclerosis, el cáncer y el proceso de envejecimiento. Los antioxidantes son compuestos que pueden retardar, minimizar o inhibir la oxidación lipídica. Cuando se adicionan a los alimentos, los antioxidantes minimizan la rancidez, retardan la formación de productos tóxicos de la oxidación, mantienen la calidad nutricional de los alimentos e incrementan la vida de anaquel de los mismos (Fukumoto y Mazza, 2000).

Los compuestos que tienen actividad antioxidante tienen funciones tales como secuestrantes de radicales libres, acomplejantes de metales pro-oxidantes, agentes reductores, etc., debido a ello, se ha

observado que tienen la capacidad de proteger al cuerpo humano de enfermedades tales como el cáncer (Bailey y Williams, 1993).

Se define como radical libre a cualquier especie química que contenga electrones no apareados en los orbitales que participan de las uniones químicas. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón. En el primer caso se trata de una oxidación y en el segundo, de una reducción. También se forman radicales cuando se rompe la unión covalente entre dos átomos. Sea cual fuere el mecanismo de la formación de un radical, el electrón desestabiliza al átomo en mayor o menor grado, ya que aumenta su contenido energético y lo torna muy reactivo. Como su tendencia espontánea es volver al estado de menor energía, cediendo o recibiendo electrones, reacciona rápidamente con otros átomos o moléculas que se encuentren cerca.

Los radicales libres son extremadamente inestables y de corta vida (duran millonésimas de segundo). Cualquier molécula que se encuentre en su vecindad inmediata se verá afectada y se transformará, a su vez, en un radical libre, lo que desata una reacción en cadena. Cuando tales especies activas se producen en la membrana celular, predomina la reacción en cadena de la lipoperoxidación con el consecuente daño a estas. El proceso de lipoperoxidación es una reacción autocatalítica: una vez comenzada, se mantiene a sí misma. Los productos finales de esta reacción -aldehídos, etano, pentano, cetonas, etc.- también contribuyen al efecto tóxico producido. En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres.

La evolución ha hecho que las células dispongan de mecanismos de protección del efecto nocivo de los radicales libres basado en un complejo mecanismo de defensa constituido por los agentes antioxidantes (Emmon y col., 1999). Estos pueden ser mecanismos enzimáticos, llamados antioxidantes endógenos que incluyen a las enzimas superóxidodismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y al glutatión y la coenzima Q₁₀ (Dröge, 2002) y los antioxidantes exógenos, que ingresan al organismo por la vía de los alimentos. Cuando llegan a las células, se depositan en sus membranas y las protegen de la lipoperoxidación. Tal es el caso de las vitaminas E y C y los carotenoides. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, estos otros reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura, es

decir, los "capturan" o neutralizan, y se oxidan en el proceso. Finalmente, algunos metales, como selenio, cobre, zinc y magnesio, que en ocasiones forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en este mecanismo de protección celular (Emmons y col, 1999). Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos grupos de acuerdo a su solubilidad: antioxidantes hidrofílicos (solubles en agua) tales como la mayoría de los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico, y antioxidantes lipofílicos (solubles en grasas) tales como carotenoides y vitaminas (Al-Farsi y col., 2005). Existen además, antioxidantes sintéticos y naturales, los primeros son compuestos con estructuras fenólicas de varios grados de sustitución, mientras que los segundos pueden ser carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles, flavonoides, etc. (Larson, 1998).

Los compuestos que se piensa son responsables de los efectos de protección de dietas ricas en frutas y vegetales incluyen carotenoides y vitaminas antioxidantes. Sin embargo, está aumentando la evidencia de que otros fitoquímicos (componentes no nutritivos) contribuyen en diversos grados a la actividad antioxidante de frutas y vegetales. Considerando esto, la atención ha sido enfocada en la significancia de compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos, flavonoides y en particular de antocianinas (Al-Farsi y col., 2005), algunos flavonoides han demostrado tener una gran capacidad antioxidante al ser ingeridos en la dieta humana (Bors y col., 1987).

Recientemente se han acumulado evidencias que sugieren la existencia de una relación entre el estrés oxidativo y el origen de numerosas enfermedades. Por ejemplo, las células fagocíticas del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) que defienden al organismo contra la agresión de agentes extraños, producen grandes cantidades de radicales libres como parte del mecanismo que les permite destruir dichos agentes. El ácido desoxirribonucleico (ADN), principal componente de los cromosomas y depositario de la información genética de la célula, también constituye uno de los mayores blancos de los radicales libres. Las mutaciones resultantes del daño producido por estos al ADN podrían conducir, en última instancia, a la pérdida del control de la división celular con la consiguiente formación de tumores (Poulson y col., 1998 ; Fang y col., 2002).

Existen, además, otras patologías en cuya generación podrían participar efectos de los radicales libres. Entre ellas se han considerado, por ejemplo, las enfermedades degenerativas del sistema nervioso (enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y de Hodgkin); cataratas; arteriosclerosis; adicciones (tabaquismo y alcoholismo); el daño tóxico agudo del hígado, el proceso de isquemia y reperfusión que

ocurre cuando un tejido sufre una interrupción transitoria del aporte sanguíneo, seguida por su restauración parcial o total como es el caso en los infartos del miocardio, en los trasplantes de órganos, cirugía cardiaca, etc.

Hay evidencias experimentales que apoyan la idea de que los antioxidantes exógenos tienen eficacia terapéutica. Estudios epidemiológicos realizados en los EE.UU. indican que la incidencia de ciertas formas de cáncer y de enfermedades cardiovasculares es menor en poblaciones cuyo consumo de vitaminas C, E y β -caroteno está por encima del promedio. También se ha determinado que la administración de dimetilsulfóxido (un antioxidante sintético) y de manitol a pacientes operados producen un aumento significativo del consumo de oxígeno por los tejidos afectados, gracias a la propensión a atrapar radicales libres que tienen esos compuestos (Haslam, 1996). Se han hecho estudios acerca de la actividad antioxidante de numerosas plantas usadas ya sea como alimentos, tal es el caso de frutos (Moyer y col., 2002; Lotito y Frei, 2004) o como medicinas tradicionales (Cai y col., 2004).

El consumo de alimentos con propiedades antioxidantes origina un incremento del nivel de compuestos con tales propiedades en el plasma sanguíneo. Ello podría explicar la llamada paradoja francesa, que consiste en la baja incidencia de enfermedades coronarias entre los franceses, a pesar de su importante consumo de ácidos grasos. La posible razón es que los vinos tintos consumidos por los franceses son ricos en sustancias conocidas como polifenoles, de reconocido poder antioxidante. De la misma manera, en diversos estudios clínicos se han demostrado las propiedades antioxidantes de algunos aditivos alimenticios de origen vegetal que contienen ginkgo (Ginkgo biloba), ajo (Allium sativum) y ginseng (Panax ginseng) (Marocci y col., 1994).

Un grupo de compuestos polifenólicos, los flavonoides, son potentes antioxidantes (*in vitro*) e incluyen compuestos como flavonas, isoflavonas, flavononas, catequinas y los pigmentos rojos, azules y morados conocidos como antocianinas. Los arándanos, las moras y la grosella son ricas fuentes de antocianinas y antioxidantes (Wang y col., 1997). Algunos estudios indican el papel terapéutico de los compuestos fenólicos en la prevención del cáncer, derrames cerebrales y enfermedades coronarias, además se ha reportado que también muestran propiedades farmacológicas como antitumorales, antivirales, antiinflamatorios e hipotensivos. Sarma y col. (1997) demostraron, que las antocianinas impiden de forma eficiente la oxidación del ácido ascórbico (Sarma y col., 1997).

Los germinados han sido ampliamente usados como “alimentos saludables”, aunado a que son una buena fuente de nutrimentos básicos, contienen importantes fitoquímicos promotores de salud y que previenen enfermedades. Durante la germinación de las semillas, se promueven las respuestas de defensa a través de la biosíntesis de compuestos fenólicos (Randhir y col., 2004).

Recientemente, se ha desarrollado un gran interés para encontrar antioxidantes de origen natural para su uso en alimentos y reemplazar así los antioxidantes sintéticos, así como para usarlos en vivo. Para evaluar los compuestos con actividad antioxidante, es necesario un método *in vitro* práctico (Fukumoto y Mazza, 2000).

Los compuestos con actividad antioxidante pueden mostrar comportamientos prooxidantes bajo ciertas condiciones. La actividad prooxidante puede acelerar el daño a moléculas tales como el DNA, los carbohidratos o las proteínas. Los potenciales antioxidantes pueden, por tanto, ser probados como prooxidantes también (Fukumoto y Mazza, 2000).

2.9. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos están representados en las plantas, por un grupo muy amplio de estructuras químicas, más de 8000, constan de un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides, según sean o no derivados de la estructura básica de floriglucinol, caracterizada por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidas por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado. Una clasificación de los compuestos fenólicos fundamentada en su estructura química se presenta en la Figura 5.

Los compuestos fenólicos además se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico; así, podemos encontrar compuestos de tipo C6-C1, derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables. De menor significancia son los compuestos de tipo C6-C2, derivados del ácido fenilacético; el grupo de fenoles simples más extenso es el C6-C3, estos compuestos, junto con los de tipo C6-C1 y C6-C2, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal, como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales.

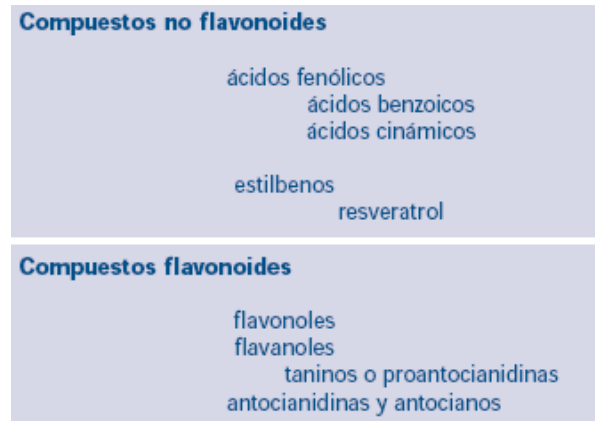


Figura 5. Clasificación de los compuestos fenólicos fundamentada en su estructura química. (Brouillard y col., 1978)

La distribución de polifenoles en las plantas es muy amplia y se han encontrado en más del 60% de las especies vegetales donde se ha investigado su presencia.

Los compuestos fenólicos de plantas son producidos por éstas principalmente para protegerse de factores de estreses bióticos y abióticos tales como la foto oxidación, especies reactivas de oxígeno, heridas, luz ultravioleta, enfermedades y ataques de animales herbívoros. Son metabolitos secundarios sintetizados principalmente a través de las vías metabólicas de las pentosas fosfato, shikimato y fenilpropanoide (Robak y Gryglewski, 1988), se localizan principalmente en el citoplasma, plástidos y vacuolas de las células (Simon, 1997). La vía del ácido shiquímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina. La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides (Marco, 2006). La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante se ignoraba en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas,

transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias.

Los polifenoles presentan diferentes actividades, los taninos, por ejemplo, confieren a las plantas que los poseen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides. Las antraquinonas son laxantes, algunas chalconas actúan como antihelmínticos y muchos isoflavonoides, son antibacterianos y antifúngicos. Además al igual que en las plantas, en el hombre los polifenoles ingeridos formando parte de alimentos pueden actuar como antioxidantes y algunos isoflavonoides tienen actividad estrogénica dada su similitud estructural con el estrógeno de síntesis dietilestilvestrol (Cook y Samman, 1996). Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro. Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Martínez y col., 2002).

Cai y col. 2004 caracterizaron la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales de 112 plantas medicinales chinas asociadas con la prevención del cáncer, ellos encontraron una relación lineal positiva entre la actividad antioxidante y la cantidad de compuestos fenólicos totales demostrando que son estos últimos los principales responsables de la capacidad antioxidante en estas plantas. Resultados similares se obtuvieron para germen de trigo, semillas de girasol, papas, cerezas, y arándanos (Velioglu y col., 1998; Cai y col., 2004).

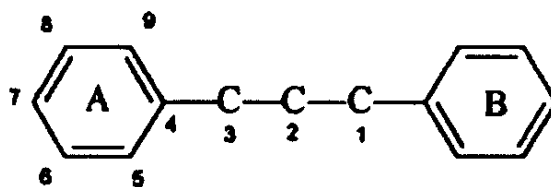
2.10. Antocianinas

Las antocianinas, pigmentos ampliamente distribuidos en los vegetales, son un grupo de flavonoides responsables de colores como el azul, el púrpura, violeta, magenta, rojo y anaranjado de algunas plantas (flores, frutas, vegetales y granos) (Delgado y col., 2000; Escribano y col., 2004).

La palabra antocianina se deriva de las palabras griegas anthos y kyanos que significan flor y azul respectivamente (Badui, 1993).

Las antocianinas se consideran flavonoides por que tienen esqueleto carbonado $C_6C_3C_6$ característico (Figura 6). En su forma natural, esta estructura se encuentra esterificada a uno o varios azúcares en cuyo caso se denominan antocianinas simples, si además del azúcar, en la molécula existe un radical acilo, entonces se llaman antocianinas aciladas. La estructura básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilo de la sal de flavilio (Figura 7). Las antocianinas existen como glucósidos de polihidroxi y/o polimetoxiderivados de la sal, difieren en el número de grupos hidroxilo y/o metoxilo presentes, los tipos, número y sitios de unión de los azúcares a la molécula y las clases y número de ácidos alifáticos o aromáticos que están unidos a los azúcares de la molécula (Escribano y col., 2004). Los azúcares más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y di y trisacáridos homogéneos o heterogéneos formados por combinación de estos azúcares. Los ácidos que participan más comúnmente en la acilación de estos azúcares son el caféico, p-cumárico, sinápico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, malónico, málico, succínico y acético (Jackman y Smith, 1992). La presencia de los grupos hidroxilo en los anillos así como de los azúcares, hace que estos compuestos sean muy solubles en agua, etanol y metanol (Escribano y col., 2004).

Cuando se hidroliza y se libera el azúcar de una antocianina, la aglicona (el producto no azúcar de la hidrólisis) se conoce con el nombre de antocianidina. Las antocianinas presentes en la naturaleza contienen diversas antocianidinas, pero en los alimentos ordinariamente solo existen seis (pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, malvidina y petunidina). Diversos factores como el cambio de pH, la formación de complejos metálicos y la copigmentación producen cambios en el color de estos pigmentos (Escribano y col., 2004).



Estructura $C_6C_3C_6$ básica

Figura 6. Esqueleto $C_6C_3C_6$ de los flavonoides.

Derivadas de estas antocianidinas, existen gran cantidad de antocianinas que difieren entre si en la naturaleza y número de azúcares unidas a la aglicona y las posición de las uniones así como la naturaleza y número de ácidos aromáticos unidos a los residuos de azúcar.

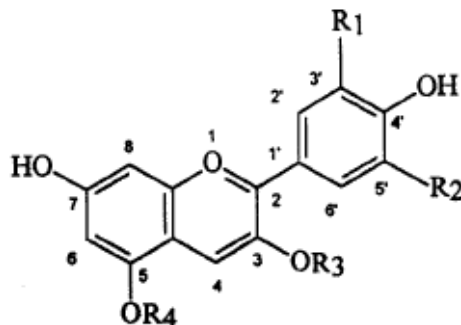


Figura 7. Estructura del 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio.

Ya que las antocianidinas son menos solubles en agua que sus correspondientes antocianinas, no se encuentran libres en la naturaleza, quizá se forman por hidrólisis durante los procesos de aislamiento. Se han identificado más de 250 antocianinas diferentes en el reino vegetal. Las plantas no sólo contienen mezclas de antocianinas, sino que sus concentraciones varían entre diferentes cultivares y con la madurez., pueden ir desde unos 20mg/ 100g hasta 600mg/100g.

La degradación de antocianinas se produce no sólo durante la extracción del tejido vegetal, sino también durante su procesado y almacenamiento.

Los principales factores que gobiernan la degradación de las antocianinas son el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno, en menor impacto, la presencia de enzimas degradativas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, iones metálicos y azúcares (Escribano y col., 2004).

Las velocidades de degradación varían entre las antocianinas debido a sus muy diversas estructuras.

Las antocianinas son relativamente inestables, pueden sufrir reacciones que alteran sus estructuras a través de la acción de diversos agentes debido a la deficiencia electrónica del núcleo flavilio. La estabilidad de las antocianinas se incrementa con el número de metoxilos en el anillo B y disminuye al aumentar los grupos hidroxilo, esto es, entre las antocianidinas más comunes, la más estable es la malvidina, seguida por peonidina, petunidina, cianidina y delfinidina (Escribano y col., 2004). El color de los alimentos que contienen antocianinas ricas en las agliconas pelargonidina, cianidina o delfinidina es menos estable que el de los alimentos que contienen antocianinas ricas en las agliconas petunidina y malvidina. La mayor estabilidad de este último grupo se debe a que los grupos hidroxilo inactivos

están bloqueados. Se deduce por tanto, que el aumento de la glicosidación, como en los monoglucósidos y los diglucósidos aumentan la estabilidad. También se ha observado, aunque no se entiende totalmente por qué, que el tipo de azúcar influye sobre la estabilidad. Las antocianinas de arándanos que contienen galactosa son más estables durante el almacenamiento que aquellas que contienen arabinosa. Las antocianinas alcanzan su mayor estabilidad en condiciones ácidas. En las soluciones acuosas e incluso en los alimentos, las antocianinas pueden existir en 4 formas estructurales, dependiendo del pH: la base quinoidal azul, el catión flavinilo rojo, la base pseudocarbinol incolora y la chalcona incolora (Lapidot y col.,1999). Las formas predominantes a cada pH en un intervalo de 0-6, cambian de acuerdo al tipo de antocianina. Con pH ácido, las antocianinas son muy estables pero la estabilidad se reduce cuando el pH se aproxima a la neutralidad, llegando a destruirse completamente cuando el pH es superior a 7, sin embargo, las antocianinas de tipo acilado son más estables y conservan su color aún en pH alcalino. La velocidad de degradación de las antocianinas se incrementa al aumentar la temperatura y el daño se acelera en valores altos de pH y/o por exposición a la luz. Por otro lado, se sabe que el color de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo (Escribano y col., 2004).

Gran parte de los estudios que existen sobre la estabilidad de las antocianinas se han desarrollado evaluando el comportamiento de estos pigmentos con pH ácido, que son los que comúnmente se presentan en los alimentos factibles de teñir con estos compuestos (Sarni y col., 1996) Fossen y col. (2001) evaluaron la estabilidad de la cianidina 3-glucósido y la petanina, que es una antocianina diglucósido con un radical acilo en su estructura, en un intervalo de pH entre 1 y 9, destacando que la petanina es estable con pH ligeramente alcalino (8 a 9), en tanto que la cianidina 3-glucósido, que es una antocianina simple monoglucósido, se modifica con pH mayor de 5 (Fossen y col., 2001).

La estabilidad de las antocianinas en los alimentos se ve notablemente afectada por la temperatura. En las velocidades de degradación influyen la presencia o ausencia de oxígeno, el pH y la conformación estructural. En general, las características estructurales que llevan a un aumento de la estabilidad del pH, también llevan a la estabilidad térmica. Las antocianidinas altamente hidrolizadas son más estables que las metiladas, glicosiladas y acetiladas.

La mayor estabilidad que muestran las antocianinas aciladas a cambios de pH y temperatura se considera que se debe a que los radicales acilo interactúan con los núcleos de flavilio y logran así dar mayor estabilidad a la copigmentación intramolecular, además de prevenir la reacción de hidratación del C2 de la molécula (Salinas y col., 2005).

Se sabe que las antocianinas tienen diversas funciones, en el caso de las flores por ejemplo, sirven como atrayentes de insectos polinizadores (Stintzing y Carle, 2004) además aparentemente actúan como defensa de las plantas contra algunos patógenos, protección contra la luz ultravioleta o intensa luz blanca, etc. (Gould, 2004; Hoch y col., 2001).

Algunos estudios han mostrado influencias positivas de las antocianinas sobre la salud, entre otras: propiedades anti inflamatorias, su capacidad de proteger a los vasos sanguíneos del daño oxidativo derivado de los altos niveles de azúcar (diabetes); en el laboratorio, se ha demostrado que inhiben el crecimiento de células tumorales humanas; los arándanos, alimento rico en antocianinas que se usan tradicionalmente para tratar úlceras, se ha observado que incrementan la producción de moco estomacal protegiéndolo de daños; en otro estudio, se observó en un grupo de 10 hombres que consumieron 1200 mg de antocianinas, un aumento en la secreción de jugos y mucus gástricos mientras que la producción de ácido permaneció constante. A pesar de estos hechos, el estudio de las antocianinas ha recibido menos atención que otros flavonoides, además, el consumo de antocianinas es relativamente bajo, por ello ciertos autores mencionan, que cuando se conozcan los beneficios del poder antioxidante de estos compuestos, se consumirán en mayores cantidades mejorando la alimentación y la salud humana (Sterling, 2000; Sterling, 2001).

Numerosos estudios han demostrado una relación positiva entre la cantidad de pigmentos y la capacidad antioxidante de frutas y vegetales como bayas de sauco (Abuja y col., 1998), té (Cao y col., 1996), arándanos (Prior y col., 1998; Moyer y col., 2002) y zarzamoras (Stintzing y col., 2002)

2.11. Actividad antioxidante de las antocianinas.

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas (Harborne y Williams, 2000; Lapidot y col., 1999). Los polifenoles son efectivos donadores

de hidrógeno, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural (Miller y Rice, 1997), debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones- π . Las antocianinas, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazados en su estructura aromática (Wang y col., 1997). Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado (Harborne y Williams, 2000). Los grupos hidroxilos libres en las posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones (Rice-Evans y col., 1996).

Generalmente para grupos de compuestos con estructuras similares todos los métodos siguen las mismas tendencias en cuanto a su actividad antioxidante. Para los derivados del ácido benzoico o cinámico, un incremento en el número de grupos hidroxilo promueve una mayor actividad antioxidante. Compuestos con tres grupos hidroxilo sobre el anillo fenólico o ácidos fenólicos o el anillo B de los flavonoides tienen alta actividad antioxidante. La pérdida de un grupo hidroxilo disminuye la actividad ligeramente, mientras que la pérdida de dos la disminuye significativamente. Dziedzic y Hudson (1983) reportan que se requieren al menos dos grupos hidroxilo para tener actividad antioxidante. Pratt y Hudson (1990) observaron que la posición y el grado de hidroxilación de los flavonoides, especialmente del anillo B juegan un papel muy importante en la actividad antioxidante de todos los flavonoides, con las configuraciones 3',4'-dihidroxi teniendo actividad antioxidante. Dziedzic y Hudson (1983) encontraron que el impedimento estérico de los grupos hidroxilo tales como la adición de grupos metoxilo pueden mejorar la actividad. Tsuda y col. (1994) encontraron que la cianidina tiene mayor actividad antioxidante que la cianidina 3-glucósido en sistemas de ácido linoleico, membranas de eritrocitos de ratón y células de hígado de rata. Pratt y Hudson (1990) observaron que los 3-glicósidos de flavonoides pueden poseer la misma o algunas veces menor actividad que sus correspondientes agliconas. Wang y col. (1997) examinaron la actividad antioxidante de varias antocianidinas/antocianinas usando el ensayo de ORAC, no encontrando tendencias consistentes entre la actividad y la glicosilación para estos compuestos. La estabilidad de las

antocianidinas/antocianinas es fuertemente afectada por el pH, la temperatura y las diferentes condiciones utilizadas en cada prueba. Muchos de los flavonoides incluyendo algunas antocianinas y antocianidinas tienen actividad antioxidante similar a las de los antioxidantes sintéticos. (Fukumoto y Mazza, 2000) Se considera que las antocianinas son pigmentos fisiológicamente activos y/o promotores de la salud debido a su papel en la prevención del riesgo de padecer enfermedades crónicas lo cual ha sido documentado. Los flavonoides y compuestos fenólicos están inversamente asociados con el riesgo de padecer enfermedades coronarias-cardíacas, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y liposomas, así como cáncer. Se ha encontrado además que las antocianinas también inhiben la oxidación de las LDL y liposomas y previenen al riesgo de varias enfermedades crónicas (Abdel-Aal y Hucl, 2003).

2.12. Antocianinas como colorantes.

Actualmente el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha sido severamente cuestionado en los países desarrollados, ya que algunos reportes indican que el consumo indiscriminado de estos pigmentos está ligado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer. De los colorantes que han sido prohibidos destacan los rojos, por lo que las antocianinas son una alternativa importante para sustituirlos. Las restricciones en el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha conducido al interés en el uso potencial de antocianinas como un colorante alimenticio en bebidas, jarabes, jugos de frutas, gelatinas, mermeladas, helados, dulces de pasta y yogures, así como en pasta dental, farmacéuticos, cosméticos y productos similares (Clydesdale y Francis, 1976). Su incorporación en alimentos tiene la ventaja no sólo de impartir color, sino que por las propiedades antioxidantes que las antocianinas poseen, se pueden considerar como alimentos funcionales. La utilización de estos compuestos como pigmentos en alimentos ha estado limitada por su susceptibilidad, entre otros factores, al pH y a la temperatura. El descubrimiento de las antocianinas de tipo acilado, que son más estables a cambios de temperatura y pH que las no aciladas, ha venido a reactivar nuevamente la búsqueda de fuentes naturales de estos compuestos para su uso como pigmentos en alimentos (Salinas y col., 2005). La piel de las uvas y la col roja son las dos únicas fuentes concentradas de colorantes de antocianinas. Debido a la estructura de los granos y sus múltiples usos en alimentos e industrias no alimentarias, los cereales azules son una promesa para la producción de

alimentos pigmentados naturalmente, alimentos funcionales, colorantes naturales, nutracéticos y sustancias de uso farmacéutico. Por ejemplo, el maíz azul y púrpura es usado para la producción de tortillas azules coloreadas naturalmente (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Las antocianinas de maíz púrpura (Zea mays) tienen una larga historia como agentes colorantes. Aparentemente ya eran usados por la antigua civilización Inca (Pascual-Teresa y Rivas, 2002; Cevallos y Cisneros, 2003). En Perú, la gente consume una bebida elaborada con maíz púrpura llamada “chicha morada” la cual ha sido usada de manera tradicional por sus beneficios para la salud. Se ha demostrado que el consumo de maíz púrpura inhibe la carcinogénesis colorectal en ratas y se asocia la bioactividad de este cultivo a las antocianinas y otros compuestos fenólicos presentes (Cevallos y Cisneros, 2003). Actualmente existen varias patentes que describen preparaciones y los procesos para su utilización como colorantes y aunque se han dado avances significativos en el estudio de la regulación genética de la biosíntesis de antocianinas, la exacta composición del pigmento no ha sido esclarecida (Pascual-Teresa y Rivas, 2002).

2.13. Antocianinas de maíz.

Las antocianinas son la principal clase de flavonoides que presentan coloraciones brillantes que van del azul al anaranjado. En maíz se ha reportado la presencia tanto de antocianinas no-aciladas, como aciladas abundando las de tipo acilado.

En el maíz, pueden formarse dos clases de antocianinas principalmente y su producción está regulada por varios genes independientes. Las 3-hidroxi-antocianinas pueden ser formadas en casi todos los tejidos de la planta de maíz, mientras que la formación de 3-desoxi-antocianinas está restringida al pericarpio y los estambres de las flores (Halbwirth y col., 2003). La genética de la pigmentación por antocianinas de las flores del maíz, ha sido estudiada por numerosos autores (Fossen y col., 2001).

Se ha reportado la presencia de cianidina 3-glucósido en la testa de las semillas, mazorcas, hojas y en general a través de las plantas. Lawson y Osude reportaron cianidina 3-galactosido así como su análogo 3-glucósido, acompañados de pelargonidina 3-glucósido en heridas de plántulas. Se ha detectado cianidina 3-galactósido acilada con ácido p-cumárico en semillas de maíz peruano oscuro y junto con cianidina 3-glucósido, aglicona libre y cianidina en hojas de maíz híbrido (Baraud y col., 1974). En mazorcas de maíz morado Boliviano, se encontraron cantidades pequeñas de pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido (Nakatani y col., 1979).

Existe una serie de genes que controlan la producción de antocianinas y pigmentos relacionados en la capa aleurona, pericarpio y tejidos de la planta de maíz. Los granos pueden ser de distintos colores dentro de la espiga o dar granos variegados. Se ha observado que la síntesis de antocianinas en el maíz, es afectada por factores ambientales estresantes como las bajas temperaturas y la luz (Taylor y Brigs, 1990; Singh y col., 1999).

México cuenta con una gran cantidad de variedades de maíz que presentan granos de colores morados, azules, rojos y guindas. En estos últimos el pigmento se localiza tanto en el pericarpio, como en la capa de aleurona y el contenido de antocianinas en el grano llega a ser de hasta 1151 mg/kg de muestra. En los granos de color guinda, la concentración de antocianinas en el pericarpio alcanza valores de hasta 1.5 %, por lo que representan una fuente importante de pigmentos naturales con colores rojos (Salinas y col., 2003). En estudios realizados por Salinas y col. (2003), se analizaron 13 tipos de maíz pigmentado, encontrándose que la ubicación del pigmento en los maíces azules es en la capa de aleurona esencialmente, lo cual tiene relevancia ya que durante el proceso de nixtamalización hay destrucción de antocianinas, siendo mayor en los maíces con pigmento en el pericarpio. Además observaron que en los maíces de grano azul la nixtamalización provoca oscurecimiento de la harina, en tanto que en los de grano rojo este proceso no tiene efecto sobre su color. Por otra parte el proceso de nixtamalización modifica el patrón de antocianinas, incrementando el porcentaje relativo de la antocianina 3 glucósido en maíces de grano azul. En dicho estudio se hace referencia a que en muchos trabajos con respecto a la estabilidad de las antocianinas, se ha evaluado la estabilidad de estas en pH ácido pues los alimentos que son factibles de ser teñidos con estos pigmentos presentan esta característica. Por otra parte, se cita a Fossen y col. (1998) quienes evaluaron la estabilidad de la cianidina 3-glucósido y la petanina que es una antocianina diglucósido con un radical acilo en su estructura, en un intervalo de pH entre 1 y 9, destacando que la petanina es estable en pH alcalino (8-9) mientras que la cianidina 3-glucósido, que es una antocianina simple monoglucósido, se modifica con pH mayor a 5. Broulliard y col. (1982), reportan que con pH alcalino, el anillo de piridio de la antocianina se rompe y el color azul desaparece para dar paso a una coloración amarillo pálida, que es representativa de la chalcona ionizada. Esta etapa no es muy estable y el color amarillo desaparece más o menos rápido dependiendo del pH. Una vez que se alcanza este estado, aun cuando se acidifique el medio, ya no es posible regenerar la estructura de la antocianina, y entonces se puede

decir que el pigmento se ha destruido. En cuanto a las antocianinas aciladas, se menciona (Salinas y col., 2003) que el enlace éster que une al radical acilo con el glucósido en este tipo de antocianinas es inestable a pH alcalino, por lo que posiblemente se rompe, liberando el radical acilo en forma del anión del ácido carboxílico derivado y quedando únicamente la antocianina simple. Por otro lado, en maíz azul se han observado incrementos en la proporción de cianidina 3-glucósido en la harina de maíz nixtamalizado con respecto a determinaciones previas a dicho proceso. Este incremento lo relacionan a la posible degradación de antocianinas de tipo acilado como las reportadas por Pascual-Teresa y Rivas, 2002, cianidina-3-(6''-malonilglucósido) y cianidina-3-dimalonilglucósido, ambas derivadas de la cianidina y posiblemente el enlace éster con el que está unido el radical malonil al azúcar sea sumamente inestable a las condiciones de temperatura y pH que se dan durante el proceso de nixtamalización, y sean degradadas a cianidina 3-glucósido.

De Pascual-Teresa y Rivas en 2002, encontraron que el contenido de cierto polvo obtenido a partir de maíz púrpura contenía 34g de antocianinas por cada 100 g de polvo, esto expresado como cianidina-3-monoglucósido; además al hidrolizar dicho polvo con ácido, obtuvieron tres agliconas de antocianinas: cianidina, pelargonidina y peonidina; por medio de HPLC acoplada a espectrofotometría de masas, identificaron: cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido además de cianidina-3-(6''-malonilglucósido), pelargonidina-3-(6''-malonilglucósido) y peonidina-3-(6''-malonilglucósido) en menor proporción.

2.14. Color en los alimentos.

La luz visible constituye sólo una pequeña parte del espectro electromagnético y se extiende aproximadamente entre los 380 y los 760 nm. En esta pequeña franja de energía está concentrado todo el universo observable por el ser humano; el mundo de la apariencia. Este abarca los aspectos de la experiencia visual por la cual pueden ser reconocidas todas las cosas. De los aspectos que comprende pueden identificarse: el brillo, lustre, turbidez, bruma, diferenciación de imágenes, reflexión, textura y otros atributos que juegan un papel importante en el juicio de los alimentos; pero ninguno tanto como el color (Manresa y Vicente, 2007) que es la propiedad óptica más importante (Calvo y Durán, 1997). El color, en el ámbito de la física óptica es un haz de radiaciones luminosas con una determinada distribución espectral. La capacidad de un material de alterar la distribución espectral

de la luz, depende de su composición química y de su estructura. Ya en el siglo XIX se encontró que algunas moléculas orgánicas tenían grupos cromóforos, es decir, estructuras atómicas que mostraban su capacidad de transformar la calidad espectral de la luz. Pigmentos naturales como la clorofila o la hemoglobina, son ejemplos de este tipo de moléculas. El color de un material que contenga estas moléculas dependerá también fuertemente de la estructura, generalmente compleja en el caso de los alimentos (Calvo y Durán, 1997).

Los consumidores manifiestan una fuerte preferencia por aquellos productos de apariencia atractiva y por supuesto, aquellos que “parecen mejores” son escogidos primero. De hecho, la apariencia y dentro de ella el atributo “color” es económicamente tan importante que ha dado origen a una ciencia y a toda una línea de equipamientos para lograr hacer mediciones objetivas pasando por los estudios y metodologías destinados a entrenar al mejor sensor: el ser humano (Manresa y Vicente, 2007).

En la industria de alimentos en particular, el color juega un importante papel en el proceso de aseguramiento de la calidad, es decir, es una característica del alimento que influye en la aceptación del mismo por el consumidor y le permite a éste establecer diferencias entre distintos productos que se presenten a su consideración. De mayor importancia tecnológica es la relación que existe entre el color y otros factores de calidad o entre aquél y la composición química o el grado de desarrollo o de alteración. La importancia tecnológica de estas relaciones, reside en la posibilidad de utilizar el color como índice de transformaciones naturales de los alimentos frescos o de cambios ocurridos en el proceso industrial (Calvo y Durán, 1997). Así, existen especificaciones internacionales para el extracto de tomate y el jugo de naranja, los cuales deben cumplirse para alcanzar los mejores precios. El color define cuando se ha terminado el proceso del tostado del café y a su vez, está estrechamente relacionado con la calidad de la infusión. Lo mismo ocurre en la producción de chocolate, la maduración de los frutos, el tiempo de horneado del pan, entre otros (Manresa y Vicente, 2007).

En ocasiones se recurre a la adición de un colorante para aumentar o conferir un aspecto más apetitoso, para semejar el producto al vegetal en su estado natural o para darle la apariencia reconocida por el consumidor a través de la experiencia. Esta práctica ha sido fuertemente criticada cuando se emplean colorantes artificiales cuya acción en el organismo no ha sido bien establecida o son definitivamente dañinos (Manresa y Vicente, 2007).

Un color puede ser descrito subjetivamente por la experiencia del observador u objetivamente, de acuerdo a su longitud de onda. Así, la luz roja tiene una longitud de onda (λ) de alrededor de 680 nm; el color anaranjado de unos 590; la amarilla alrededor de 575; verde 520; azul 480 y violeta 450; todas ellas comprendidas en la llamada luz blanca tal como fue demostrado por Newton al hacerla pasar a través de un prisma. Sin embargo, el término “luz blanca” tiene connotaciones diferentes. No es lo mismo leer esta página con un bombillo fluorescente, uno incandescente, la luz diurna al amanecer, al mediodía o en un atardecer neblinoso. Todas ellas contienen los diferentes colores del espectro pero en distinta proporción. La fluorescente tiene más azul y la incandescente más rojo y amarillo por tanto, al momento de describir el iluminante es conveniente hacerlo en términos de su longitud de onda. Esto puede hacerse midiendo la energía relativa emitida por la fuente de luz a todas las longitudes de onda del espectro visible y graficando los resultados (Manresa y Vicente, 2007).

Puesto que el color observado no es más que la luz reflejada es evidente que mientras más rojo incida en un producto que es de manera natural rojo como el jugo de tomate, más luz roja reflejará y el producto se verá mejor por parte del consumidor. Este aspecto adquiere importancia no sólo desde el punto de vista comercial, sino al especificar el color de un producto en una norma de calidad. Por esta razón la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, Commission Internationale l’Eclairage) ha definido los iluminantes CIE A, B, C y más recientemente los de las series D y F. Estos iluminantes responden a la necesidad de simular instrumentalmente y de manera normalizada, las condiciones naturales bajo las cuales se observa el color (Manresa y Vicente, 2007; Calvo y Durán, 1997).

En la Tabla 3 se muestran características de algunos iluminantes:

Tabla 3. Diferentes iluminantes definidos por la CIE.

Iluminante	Simula a:	Temperatura de color (K)
A	Lámpara de filamento incandescente	2854
B	Luz del medio día	4870
C	Luz diurna promedio	6750
D₆₅	Luz natural del día (Iluminante C+UV)	6500
F₂	Lámpara fluorescente blanca	4200
F₇	Lámpara fluorescente luz del día.	6500

Manresa y Vicente, 2007.

Cada iluminante, por supuesto, tendrá un comportamiento diferencial en cuanto a la emisión de energía a lo largo del espectro de luz visible. Los iluminantes de la serie D son los más representativos de la distribución espectral de la luz blanca y son los más utilizados en la actualidad, aunque por lo

extendido de su uso a lo largo de 30 años, el iluminante C continúa siendo un estándar de comparación (Manresa y Vicente, 2007).

Los iluminantes de la serie F son lámparas fluorescentes con diferente distribución de energía espectral. Estos iluminantes simulan las lámparas fluorescentes que se utilizan por lo general en los comercios y en el hogar (Manresa y Vicente, 2007).

En los alimentos el factor más importante que influye en la reflexión de la luz es la difusión debido a las características físicas de la superficie. De forma general puede afirmarse que la reflexión especular ocurre en un ángulo de 90° con respecto a la luz incidente y es la responsable principal del brillo del material; mientras la reflexión difusa ocurre a un ángulo de 45° y es la principal responsable del color. Estas particularidades son sumamente necesarias al momento de efectuar mediciones con iluminante específicos pues, del ángulo de incidencia de la luz en la muestra y la posición de ésta con respecto al sensor (ya sea objetivo o subjetivo), dependerá el atributo medido (Manresa y Vicente, 2007).

Se han definido como aspectos importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar un color:

1. El tipo de iluminante empleado.
2. El ángulo de iluminación y de visión. (Manresa y Vicente, 2007)
3. Unidades matemáticas apropiadas

Cuando se quiere imitar la luz blanca, llamando así a la luz diurna procedente del norte, se usa el iluminante C, con una temperatura de color de 6750 K, este iluminante ha sido el más utilizado hasta ahora en especificación y medida de parámetros de color.

Para la realización de las observaciones, la CIE sitúa al observador a 45.7 cm de distancia de la muestra y un ángulo de visión de 10°.

Sistema CIE. Mezclando cantidades apropiadas de tres estímulos fundamentales, se puede obtener un gran número de colores. Siendo P el color problema y R, G y B los estímulos primarios: rojo, verde y azul, la igualación del color se consigue de acuerdo con:

$$P=R+G+B$$

Pero hay casos en que la igualación solo se consigue en términos de:

$$P+R=G+B$$

O, lo que sería lo mismo:

$$P=G+B-R$$

Como no es lógico que un componente primario tenga valores negativos, se idearon los colores primarios ideales X, Y y Z que se deducen matemáticamente de los colores primarios reales R, G y B. La CIE, llama valores triestímulo a las cantidades de cada primario ideal necesarios para igualar a un color problema.

De los tres valores triestímulo Y fue elegido por la CIE de tal manera que corresponde exactamente con la curva de visibilidad del ojo humano. De esta forma, los valores de Y dan directamente la claridad.

Para evaluar la cromaticidad se definen las llamadas coordenadas de cromaticidad: x,y,z; las cuales se obtienen al expresar los valores triestímulo (X, Y , Z) como fracciones de su suma total. Matemáticamente se expresan como:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad z = \frac{Z}{X+Y+Z}$$

En la práctica basta calcular dos de ellos ya que el tercero se deduce de la ecuación:

$$x+y+z=1$$

La representación de los colores espectrales en términos de x, y, da lugar al gráfico en forma de herradura denominado diagrama de cromaticidad, tal como se muestra en la Figura 8.

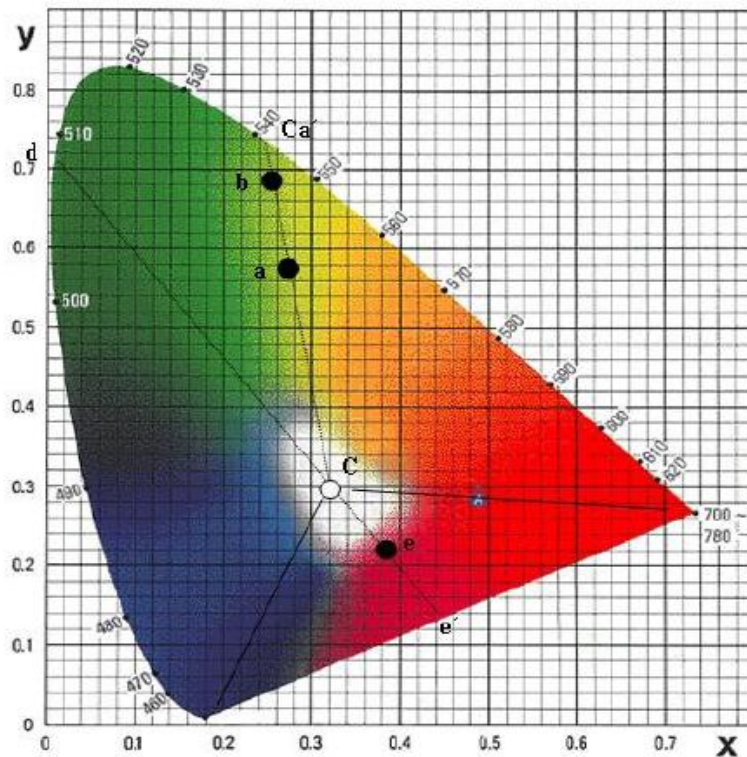


Figura 8. Diagrama de cromaticidad para el iluminante C (Manresa y Vicente, 2007)

Los valores de x, y de un color llevados al diagrama nos dan su cromaticidad, o sea su longitud de onda predominante y su pureza. La longitud de onda predominante es una magnitud psicofísica que se corresponde con la percepción sensorial del tono.

En el caso de que el punto que define el color esté situado en la zona de los colores llamados “púrpura” (púrpura, malva, lila, magenta, etc.), o sea el triángulo 400nm-700nm, su espectro de reflexión presenta máximos en la zona de los azules y de los rojos, y un mínimo en la zona de los verdes. Estos colores no existen como luces monocromáticas seleccionadas del espectro visible sino que se obtienen por mezcla aditiva de radiaciones de los extremos del espectro visible. Son colores reales pero no espectrales en contraposición con los colores azules, verdes y rojos que son colores reales y espectrales.

Sistema Hunter. Paralelamente al desarrollo de los colorímetros triestímulo, se desarrolló el sistema L, a, b de Hunter. Con estas nuevas coordenadas se define un espacio cartesiano en el que L corresponde a la claridad y a y b a la cromaticidad. Concretamente a define el componente rojo-verde; rojo para valores positivos y verde para valores negativos. El parámetro b define el componente amarillo-azul; amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos.

Sistema CIELAB. En el año de 1971 la CIE propuso un nuevo espacio cromático por transformaciones no lineales del sistema CIE 1931 al que se denomina CIELAB. En este nuevo sistema, se define un espacio en coordenadas rectangulares (L*, a*, b*) junto con otro en coordenadas cilíndricas (L*, H*, C*).

La equivalencia entre las coordenadas CIELAB y CIEXYZ es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 L^* &= 116\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - 16 \\
 a^* &= 500\left[\left(\frac{X}{X_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}}\right] \\
 b^* &= 200\left[\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Z}{Z_n}\right)^{\frac{1}{3}}\right]
 \end{aligned}$$

Donde X, Y, Z son los valores triestímulos de la muestra y X_n, Y_n, Z_n los del punto acromático correspondiente a al iluminante empleado.

Un color blanco de referencia, para el que $Y = Y_n$, tiene por tanto un valor $L^* = 100$ y un negro perfecto, para el que $Y = Y/Y_n = 0$, tiene un valor de $L^* = 0$.

Un gris que para el ojo parece estar a mitad entre el negro y el blanco tiene un valor L^* cercano a 50.

L^* es 0 para un absorbente perfecto mientras que es 100 para un difusor perfecto.

Con L^* fijado, el color se puede representar con las coordenadas rectangulares a^* y b^* . Pero, además también se puede hacer con las coordenadas polares C^* y H^* , definidas así:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$H = \arctan (b^* / a^*)$$

Los valores de C^* y H se corresponden respectivamente con croma (*chroma*) y tono o matiz (*hue*).

El valor de H^* es el ángulo del tono, y se expresa en grados que van de 0° (inclusive) a 360° (excluido).

Los tonos correspondientes a los distintos ángulos de matiz o tono son aproximadamente:



En general (Figura 9):

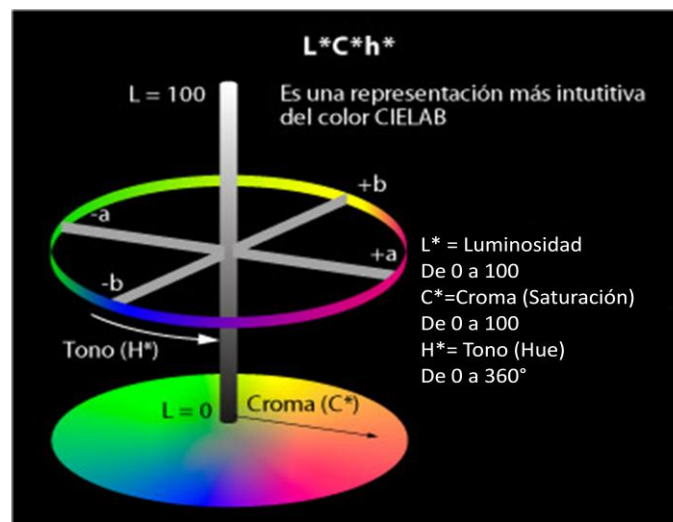


Figura 9. Diagrama representativo del sistema cilíndrico CIELCH

Tono (H^*): matiz, tinte, color, "HUE": Caracterizado por la longitud de onda de la radiación. Es lo que hace diferente un color de otro, por ejemplo, rojo, verde, etc.



Luminosidad (L^*): Brillantez, brillo, "VALUE": Dado por el contenido total de energía. Da lugar a los colores claros y oscuros.



Croma (C^*): Saturación, intensidad, pureza, "CHROMA": Define la intensidad o pureza espectral del color que va de los tonos grises, pálidos, apagados a los más fuertes y vivos.



Otro aspecto sobre el que se ha trabajado intensamente es en el de especificar la diferencia de color entre dos muestras por medio de un solo número. Sería deseable que, conocidas las condiciones de observación y los valores triestímulo de dos estímulos de color, pudiésemos obtener un número (ΔE) que fuese "representativo" de la diferencia de color percibida entre dichos estímulos (ΔV).

Desde la perspectiva actual, el principal mérito de una fórmula de diferencia de color radica en que los valores de ΔE que suministra estén altamente correlacionados con las diferencias de color visualmente percibidas ΔV (Melgosa, 2001).

La mayoría de las fórmulas de diferencia de color modernas parten, más que de los valores triestímulo de las muestras, de sus correspondientes coordenadas en el sistema CIELAB, o de su correspondiente sistema CIELCH.

Actualmente el cálculo de diferencias de color interesa, y se realiza de hecho, en muy diversas aplicaciones de la Colorimetría. Así, por ejemplo, cuando se habla de la degradación del color en alimentos (Melgosa, 2001).

Las diferencias umbrales constituyen el límite perceptivo inferior, y son de indudable interés científico (por ejemplo, para estimar cuál sería el máximo número de colores discernibles por el ojo humano). No obstante, en numerosas situaciones prácticas, y en particular en la industria, se trabaja también con diferencias de color de tamaño superior al umbral. Pasamos así de los umbrales o diferencias de color justamente perceptibles a diferencias de color de mayor tamaño, denominadas diferencias aceptables o tolerancias de color

Podría decirse que una diferencia de color entre 0.38 y 0.73 unidades CIELAB es una diferencia de color aproximadamente umbral o apenas perceptible, y calificar como supraumbral una diferencia de color

en torno a 1.75 unidades CIELAB. Por encima de 5.0 unidades CIELAB podríamos ya hablar de “grandes diferencias de color” (Melgosa, 2001).

Conociendo los valores XYZ y CIELAB para dos muestras dadas se puede determinar la diferencia entre ambas y conocer cuán grande o pequeña es esa diferencia para un atributo en particular.

El sistema Hunter Lab es el primero que utiliza el espacio euclidiano para determinar la diferencia de color total entre dos muestras. En la actualidad el sistema de color $L^*a^*b^*$ se usa con mucha frecuencia en el control de la calidad del color. Sin embargo, el grado de diferencia del color (ΔE^*) en este sistema, no siempre responde al grado de diferencia de color percibida por los humanos.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Por ejemplo, para un color con baja cromaticidad el ΔE^* calculado es, generalmente, menor que la diferencia de color percibida por los humanos.

Las mayores diferencias se detectan en el tono y la saturación. El ojo humano detecta primero las diferencias de tono, luego las de saturación y por último las de claridad. Por tanto, el hombre acepta por lo general cambios más grandes en L que en C (matiz y saturación) (Melgosa, 2001).

2.15. Análisis de imagen.

Desde el descubrimiento del microscopio de luz, se han examinado pequeñas cantidades de material biológico como partes de animales, plantas o minerales, además se ha usado para detectar la alteración de alimentos. Es de interés el hecho de que el uso del microscopio se usara con mayor frecuencia en la antigüedad que en tiempos modernos; a partir de la combinación de los microscopios con equipo y programas computacionales, la microscopía y el análisis de las imágenes obtenidas ha resurgido de forma importante aportando datos y metodologías innovadoras a las ciencias de los alimentos. El análisis de una imagen comienza cuando dicha imagen es obtenida, dependiendo del equipo, la información puede ser digital o análoga, los sistemas modernos de análisis, comienzan con la conversión de la información de una señal análoga a una digital, el resultado es un juego de píxeles. Los instrumentos usados para capturar imágenes pueden ser cámaras, escáneres, etc. Las cámaras de color son usadas en áreas de microscopía en la cual el color es un elemento de importante consideración.

Las preparaciones microscópicas, transparencias, negativos, o geles, son puestas en placas y escaneadas empleando sensores para crear una imagen digital.

Atributos externos como tamaño, forma, color, superficie y textura pueden ser evaluados por medios ordinarios tales como una cámara, estas son frecuentemente empleadas por los sistemas de procesamiento de imagen, pueden convertir luz en cargas eléctricas y crear imágenes de alta calidad, poco ruido, con muchos píxeles y excelente sensibilidad a la luz, con lo cual se logra una nula o mínima distorsión geométrica. La iluminación es un importante requisito de la adquisición de la imagen. La calidad de la imagen capturada puede ser significativamente afectada por la iluminación. Una alta calidad de imagen puede ayudar a reducir el tiempo y complejidad del subsecuente procesamiento de imagen lo cual puede disminuir el costo de un sistema de procesamiento de imagen. La imagen digital puede ser de color o monocromática, refiriéndose esta última como una imagen de escala de grises.

La base para el análisis de imágenes es convertirla a píxeles con niveles de grises dentro de las evaluaciones numéricas pueden ser aplicados distintos algoritmos y estos niveles de grises pueden ser influenciadas por las características físicas de los objetos y la orientación de la fuente de luz. La iluminación puede producir sombras dentro del proceso de análisis de imagen, debido a esto el primer paso antes del proceso es la aplicación de uno o varios filtros para remover ruidos no deseados. Después de la digitalización y consecuente filtración de la imagen, sigue en algunos casos la binarización donde el nivel original de grises es cambiado por colores continuos o imágenes en blanco y negro asignando a cada píxel un valor. Una vez binarizadas las imágenes pueden ser segmentadas en estructuras medibles sobre la base del color, como brillo, discontinuidad de bordes temperatura o alguna otra propiedad que pueda ser utilizada para distinguir algún rasgo del fondo. "Thresholding" es la técnica de segmentación más sencilla y más comúnmente usada. La segmentación se refiere al proceso de extraer el objeto de interés deseado del total de la imagen y es el último paso antes del análisis de la imagen, es a partir de esta imagen segmentada que se pueden hacer las diferentes mediciones. (Aguilera y Stanley, 1999) La extracción de datos cuantitativos a partir de la imagen es la principal meta del investigador. Se pueden obtener infinidad de medidas entre las que destacan el área, perímetro, compactibilidad, curvatura, elongación, rugosidad, etc. Estas son medidas de partículas que en alimentos son pequeños objetos de diversos orígenes como polvos de harinas, cristales, burbujas, vesículas, etc. Asignar valores a estos parámetros, es la base de la microscopia

moderna. Las partículas encontradas en los alimentos, tienen dimensiones denominadas como fractales, los objetos fractales, son aquellos descritos en funciones de números fraccionarios, no enteros, y la dimensión fractal (D) es una medida de la irregularidad de un objeto, esta D , es posible medirla usando herramientas de análisis de imagen. Ya que muchos materiales usados como alimentos son complejos e irregulares, su descripción a través de la geometría fractal permite la correcta cuantificación de sus características. (Aguilera y Stanley, 1999).

2.16. Dimensión fractal.

Aproximadamente desde hace 30 años, se ha estado produciendo una revolución en el mundo de las ideas científicas, el surgimiento de la geometría fractal y el caos aportó nuevas ideas para el entendimiento de múltiples fenómenos (Braun, 1996). Ya en el siglo XVII se conocían funciones con enormes irregularidades y discontinuidades, sin embargo, los estudiosos de aquella época supusieron que dichas funciones eran escasas y las consideraban excepciones o las trataban con aproximaciones o redondeos que siguen siendo exitosamente empleados y que, sin embargo, hoy se sabe se pueden volver peligrosos en sistemas con dinámica caótica (Braña, 2003).

Es a partir de que en 1977 Benoit Mandelbrot en su libro “La Geometría Fractal de la Naturaleza” acuña el término fractal, cuando se dirige la atención hacia estas teorías y términos hasta entonces meramente matemáticos comienzan a ser empleados en muchas otras ciencias. Por otro lado, la disponibilidad generalizada de herramientas computacionales ha contribuido de forma importante al desarrollo de éstas metodologías. La geometría fractal ha cambiado de manera importante la forma en que científicos e ingenieros perciben y por tanto modelan el mundo en el que vivimos (Addison, 2001). En términos generales:

- 1) Los Fractales son los objetos matemáticos que conforman la Geometría de la Teoría del Caos.
- 2) La Geometría Fractal es también conocida como la “Geometría de la Naturaleza.
- 3) La palabra Fractal, enunciada por Mandelbrot, proviene del latín y significa roto, quebrado.
- 4) La Geometría Fractal es un nuevo lenguaje; ya que los puntos, rectas, esferas, elipses y demás objetos de la geometría tradicional son reemplazados por algoritmos iterativos computacionales que permiten describir sistemas naturales, caóticos y dinámicos.
- 5) Los fractales son objetos cuya dimensión es no entera o fraccionaria.

6) Un objeto fractal es aquél que su dimensión fractal de supera a su dimensión topológica.

7) Un objeto fractal es aquél que posee las siguientes dos características:

a) Autosimilitud. Cada porción de un objeto tiene las mismas características del objeto completo. También se puede decir que cada área de un fractal conserva, de manera estadísticamente similar, sus características globales.

b) Dimensión Fractal. El matemático griego Euclides (aprox. 300 A.C.) escribió “Los Elementos”, en esta obra, presentó de manera formal el estudio de las propiedades de líneas, planos y volúmenes, es decir, de las formas regulares (Braun, 1996). En la geometría Euclidiana un punto tiene una dimensión de cero, una línea de uno, una superficie de dos y un volumen de tres (Peleg, 1993). Sin embargo, las teorías de Euclides constituyen una considerable abstracción de la realidad. Por ejemplo, supone que un punto no tiene tamaño, una línea solo tiene longitud y un plano no tiene ancho. Dichas consideraciones, han servido no solo para explicar, sino también para predecir y modelar innumerable cantidad de fenómenos naturales, sin embargo, de forma estricta, los círculos, cuadrados, prismas triangulares o cuadrangulares, etc., no existen en la naturaleza, de tal forma que longitudes, áreas o volúmenes de objetos naturales no pueden ser adecuadamente descritos por la geometría Euclidiana.

El ejemplo clásico para ilustrar este fenómeno, es aquel en el que se trata de calcular la distancia entre un punto A y otro punto B de una costa. En primera instancia, se trazará una línea recta entre los dos puntos, sin embargo, la distancia real (si camináramos por la costa), sería mayor debido a su irregularidad. Si ahora tomáramos una unidad de medida arbitraria de longitud H y contáramos las veces que la barra cabe a lo largo de la costa desde A hasta B, éste número sería L_1 . Si para mejorar nuestra medición, tomamos otra unidad de medida, por ejemplo H/10 y repetimos el procedimiento anterior, la longitud de la costa sería L_2 . Si tomáramos así cada vez una unidad de medida más pequeña, observaríamos que la longitud de la costa es cada vez mayor, es decir, es infinita.

La dimensión Euclidiana de un objeto relaciona la unidad de medida utilizada con el valor geométrico medido de la siguiente forma:

$$N(L) = (1/L)^D$$

Donde:

1/L corresponde al número de unidades comprendidas en uno de los lados,

D es la dimensión y corresponde a 1 para una recta, 2 para una superficie y 3 para un volumen.

Si se generaliza la utilización del concepto de la dimensión D a los números fraccionarios obtenemos una dimensión fractal, es decir, cuando la D es un número no entero, se dice que el objeto tiene una dimensión fractal.

Una de las metodologías para el cálculo de la dimensión fractal en el denominado “Conteo de cajas” que se basa en la correspondiente medición del número de recubrimientos o cajas necesarias para cubrir un determinado conjunto (línea, superficie o volumen) $N(L)$ en función de la escala L de los recubrimientos (o cajas). El correspondiente cálculo de la dimensión fractal, D , es sólo válido en el rango en el que la relación entre N y L es potencial y está bien definida mediante la expresión:

$$D = \log (N(L)) / \log (1/L)$$

La D es la pendiente de la recta que se obtiene al graficar logaritmo del número de cajas contra el logaritmo de la escala, en la figura se observa la D obtenida para un objeto propio de la geometría Euclidiana como una recta, un área o un volumen, y aquella que pudieran tener algunos objetos fractales.

8) Un fractal es un objeto en el cual sus partes tienen “alguna” relación con el todo (esto está íntimamente ligado a la Autosimilitud).

La primera mención de fractal en el contexto de los alimentos es el libro de Mandelbrot en el cual se hace una simulación en computadora de los patrones de los ojos de los quesos Suizos Apenzeller y Emmental. Actualmente se han hecho mediante análisis fractal, estudios en que se relacionan las dimensiones de las siluetas de aglomerados de partículas (por ejemplo café) con su tendencia a desintegrarse en un medio acuoso (Peleg, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

De entre todos los cultivos de cereales consumidos en el mundo, el maíz, es el de mayor importancia en México, no solo porque es el que más se consume y porque constituye una fuente esencial de nutrimentos para el grueso poblacional, sino porque en su cultivo se ha cimentado el desarrollo cultural de los pueblos mesoamericanos, sin embargo, la mayoría de los productos alimenticios elaborados artesanalmente y que representan parte fundamental de este desarrollo cultural no han sido estudiados, menguando así potencial nutricional y económico que estos alimentos aportarían a sus productores y consumidores.

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos, entre ellos las antocianinas poseen una notable capacidad antioxidante, en el caso de la planta del maíz, estos compuestos se han aislado de las flores y han sido usados como colorantes naturales para alimentos; en el caso del grano, es en las variedades coloreadas (azul y rojo), donde se ha encontrado una cantidad importante de estos compuestos.

En los últimos tiempos, se ha promovido el consumo de alimentos cuyos constituyentes tienen propiedades antioxidantes ya que se ha observado una relación positiva entre su consumo y la baja incidencia de enfermedades como el cáncer atribuidas a un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del propio organismo para secuestrarlos.

En países como México y Perú, es usual el consumo de alimentos elaborados con maíz azul, sin embargo, el cambio en la cantidad y/o estructura de las antocianinas durante el procesamiento del maíz no ha sido estudiado salvo por la nixtamalización que es quizá el proceso más ampliamente difundido. La capacidad antioxidante que las antocianinas de maíz azul puedan aportar al organismo aún después de ser procesado, contribuiría de manera significativa al conocimiento y consumo de productos como el tescüino y a su más adecuada valoración nutritiva.

4. HIPÓTESIS

Durante la elaboración del tesgüino, es posible que la cantidad y tipo de compuestos fenólicos presentes en el maíz azul usado como materia prima principal cambien, modificando además su capacidad antioxidante.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Determinar los cambios en compuestos fenólicos y antocianinas, así como la variación en la capacidad antioxidante durante el proceso de elaboración de tesgüino usando como materia prima principal maíz azul (Zea mays).

5.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar el maíz azul utilizado como materia prima principal.
- Obtener la mejor combinación de agua, tiempo y temperatura para la etapa I (de imbibición) de la germinación del grano de maíz azul.
- Estudiar los cambios en pigmentación del maíz azul durante las distintas etapas de la germinación del grano.
- Obtener los gráficos de variación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y capacidad antioxidante durante la etapa inicial de germinación para elaboración de tesgüino.
- Elucidar un modelo descriptivo para el cambio estructural del grano de maíz en estudio durante las distintas etapas de germinación.
- Fijar las condiciones de elaboración de tesgüino en el laboratorio.
- Obtener los gráficos de variación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y capacidad antioxidante durante las distintas etapas de elaboración de tesgüino subsecuentes a la etapa inicial de germinación.
- Obtener las cinéticas de crecimiento microbiano durante las dos etapas de fermentación del tesgüino.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- 6.1.** Caracterización del maíz azul que se utilizó en este estudio.
- 6.2.** Determinación de las condiciones de germinación más adecuadas.
 - 6.2.1.** Cantidad de agua necesaria para la imbibición del grano.
 - 6.2.2.** Tiempo de remojo.
 - 6.2.3.** Temperatura.
 - 6.2.4.** Tiempo de germinación.
- 6.3.** Determinación de los cambios de humedad, antocianinas, compuestos fenólicos totales y capacidad de secuestro de radicales libres durante el proceso de germinación.
- 6.4.** Estandarización del proceso de elaboración del tescüino en cuanto a cantidades, tiempos y temperaturas para asegurar la repetitividad de las determinaciones subsecuentes. En la Figura 10, se muestran los parámetros a considerar.
- 6.5.** Determinación del cambio en la concentración de antocianinas, compuestos fenólicos totales, capacidad de secuestro de radicales libres y humedad con respecto al tiempo en las diferentes etapas del proceso de elaboración del tescüino.
 - 6.5.1.** Durante la primera fase de germinación.
 - 6.5.2.** Durante la germinación por un día más.
 - 6.5.3.** Después de la molienda.
 - 6.5.4.** Durante la cocción en agua.
 - 6.5.5.** Después del colado.
 - 6.5.6.** Durante la fermentación (primeras 24h).
 - 6.5.7.** Después de la mezcla del por la adición de más sustrato.
 - 6.5.8.** Durante la segunda fermentación (26h más)
 - 6.5.9.** En el tescüino terminado.
- 6.6.** Elaboración de los gráficos de variación de antocianinas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante con respecto al tiempo. Los gráficos de variación que se obtendrán finalmente se presentan en la Tabla 4. La separación en tiempo para la toma de muestras dependerá del tiempo de duración propuesto para cada etapa del punto 6.5

6.7. Además, se determinarán las cinéticas de crecimiento microbiano para Lactobacillus plantarum y Saccharomyces cerevisiae y de producción de etanol y ácido láctico.

Tabla 4. Gráficos de variación a obtener durante el proceso de elaboración de Tescüino.

ETAPA		FENOLES TOTALES	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	ANTOCIANINAS
Antes de separar los lotes	Germinación	•	•	•
En el Lote 1	Germinación (24 h más)	•	•	•
	Cocción	•	•	•
En el Lote 2	Cocción	•	•	•
	Fermentación 1	•	•	•
Después de mezclar ambos lotes.	Fermentación 2	•	•	•

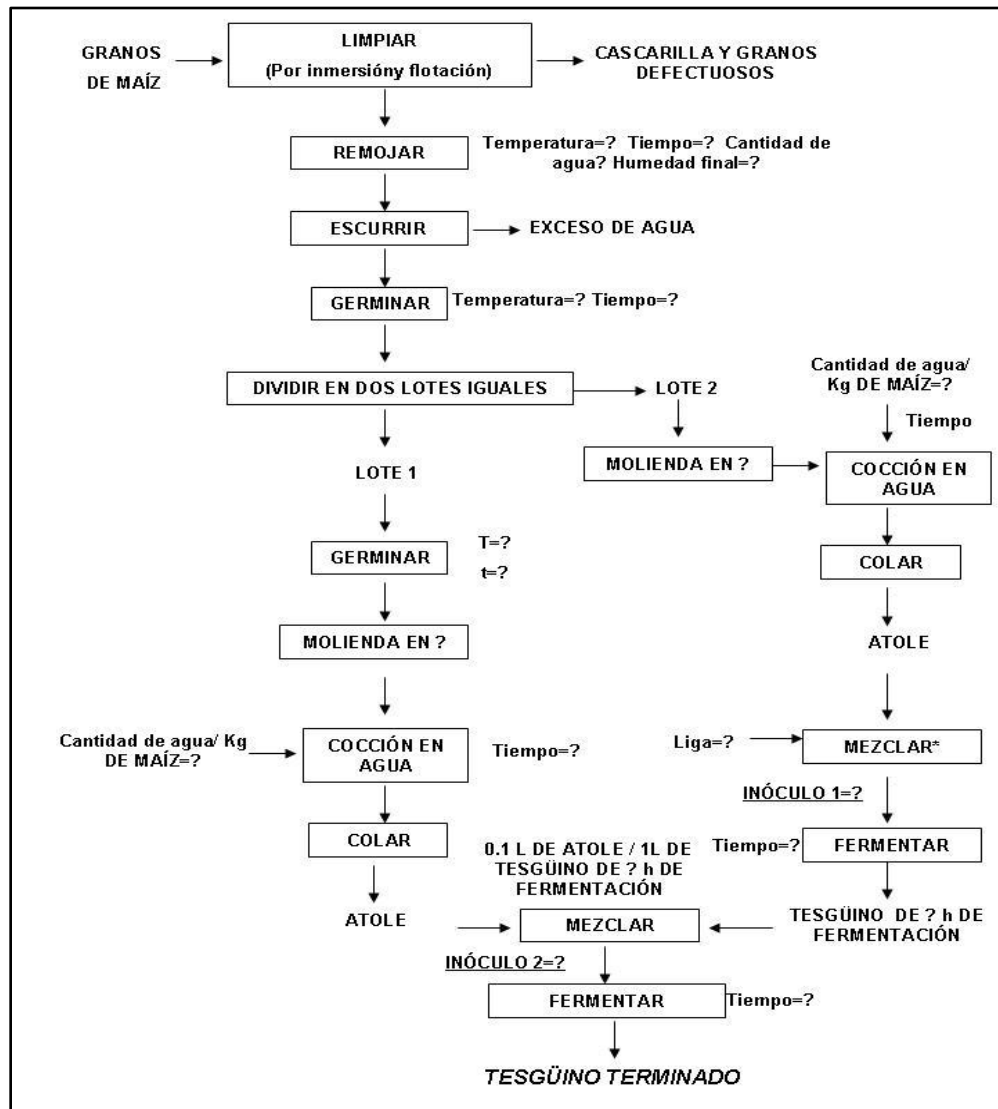


Figura 10. Diagrama de flujo del desarrollo experimental correspondiente a la estandarización del proceso de elaboración de tescüino.

7. MATERIALES

7.1. Materia prima.

Maíz azul obtenido en la zona de Amecameca, Estado de México.

7.2. Cepas.

Los cultivos utilizados serán *S. cerevisiae* (aislada de cerveza) y *L. plantarum* (aislado de col agria), cepas NRRL B-12632 y NRRL B-4495 provenientes de la USDA (United States Department of Agriculture) Research, Education and Economics Agricultural Research Service. Frotis de estos microorganismos se muestran en las fotografías que se muestran a continuación (Figuras 11 y 12).

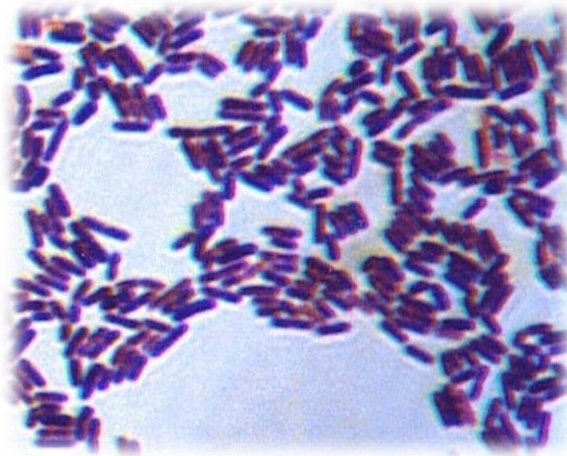


Figura 11. Fotografía de L. plantarum obtenida de un frotis teñido con tinción de Gram (100X)

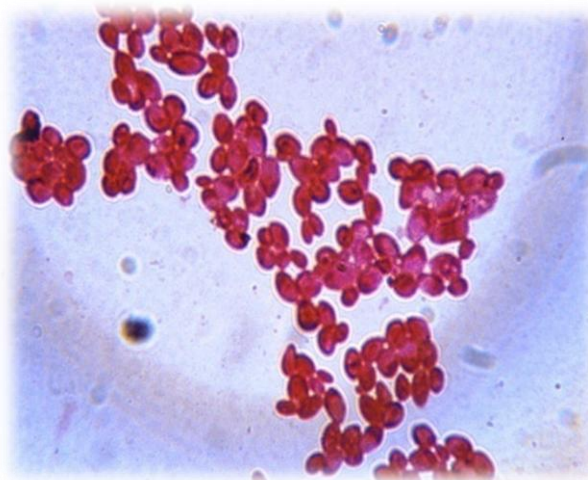


Figura 12. Fotografía de S. cerevisiae obtenida de un frotis teñido con safranina (100X)

7.3. Equipo:

- Incubadora con control de temperatura (Craft)
- Incubadora con agitador orbital (New Brunswick Scientific)
- Campana de flujo laminar (Holteen-lamin air HB2448)
- Esterilizadora automática (Tuttnauer Brinkmann 2540E)
- Centrífuga (Beckman Coulter Alegria X-12 R)
- Microcentrífuga (Hettich universal)
- Potenciómetro (Orion 920 A)
- Agitador mecánico (Thermolyne Maximix plus)
- Plancha de calentamiento con agitador magnético (Barnstead Thermolyne cimarec)
- Termómetro bimetálico digital (CDN 0° - 240° C)
- Balanza granataria digital (Mettler-Toledo AG)
- Balanza analítica (Mettler AE 100)
- Termobalanza automática (Mettler LJ16)
- Espectrofotómetro (Jenway UV/VIS 6405)
- Espectrofotómetro-Colorímetro (Milton Roy Color Mate HDS)
- Cámara fotográfica digital (Sony Cyber Shot 4.1 MP)

7.4. Instrumental. El de uso común en el laboratorio.

7.5. Reactivos:

- Agua destilada tipo 2
- Etanol absoluto
- Metanol grado reactivo
- Reactivo de Folin Ciocalteau
- Ácido tricloroacético
- Glicina
- Agar Bacteriológico
- 2,3,5 trifeniltetrazolio
- Cloruro de sodio grado reactivo
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)
- 2,2'-azinobis 3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS)
- Reactivo de Wesselow
- Persulfato de potasio grado reactivo
- Reactivo NAD-ADH (Sigma)
- Ácido clorhídrico concentrado
- Bicarbonato de sodio grado reactivo
- Hidróxido de sodio valorado 0.1 N
- Dextrosa bacteriológica
- Sulfato de magnesio
- Sulfato manganoso

8. MÉTODOS

8.1. Caracterización del grano de maíz.

8.1.1. Aspecto. Se observó la muestra sobre una superficie limpia, se registró el aspecto del grano (normal, sucio, dañado, mezclado, manchado, quebrado, desnudo o contaminado) (González, 1995).

8.1.2. Impurezas. Se pesaron 100g de muestra y se depositaron sobre una criba de 4.5/64'' x 3/4' y se golpeó suavemente para permitir que se separe el grano de todos los materiales extraños, se separaron manualmente las impurezas que quedaron sobre la criba y se reunieron con las que pasaron ésta. Se registró su peso en gramos y el resultado se expresó como porcentaje de impurezas (González, 1995).

8.1.3. Peso Hectolítrico. Se requiere un embudo especial (dimensiones: largo total de 8pulgadas, largo del cono de 6.5 pulgadas, largo del tubo de 1.5 pulgadas, diámetro superior de 3.5 pulgadas, diámetro de salida de 1.25 pulgadas) con una válvula. Se colocó una probeta graduada de 250 mL sobre una base firme y nivelada con la válvula cerrada, se introdujo el tubo del embudo en la probeta. Se pesaron 110g de grano libre de impurezas y se vaciaron sobre el embudo, éste se sostuvo firme apoyándolo sobre la probeta y se abrió la válvula permitiendo la caída libre del grano dentro de la probeta, se leyó el volumen ocupado por el grano dentro de la probeta, si la superficie resultó inclinada, se repitió la operación. No debe sacudirse ni golpearse la probeta durante la operación. El peso hectolítrico se calculó por medio de la siguiente ecuación (AACC, 1983):

$$\text{peso hectolítrico} = \frac{P}{V} \times 100$$

Donde:

V= volumen leído

P= 110g

8.1.4. Viabilidad del grano. Se tomaron 50 granos limpios y se les realizó un corte longitudinal de forma que el embrión quedó expuesto, se seleccionaron las 50 mitades en que el embrión no haya sido dañado y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionó cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio hasta cubrir

la muestra y se mantuvo a 45°C en baño de agua por 10 minutos, transcurrido este tiempo, se lavaron los granos para detener la reacción. La aparición de un color rojo intenso es señal de la viabilidad del grano, la ausencia de coloración o tonalidades claras indican muerte y baja viabilidad respectivamente. El porcentaje de viabilidad se calculó con la siguiente expresión (González, 1995):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{número de granos viables}}{50} \times 100$$

8.1.5. Energía germinativa. Se tomaron 100 granos de maíz, se distribuyeron en forma homogénea sobre una hoja de cartón y esta a su vez, se colocó sobre una cama de algodón saturado de agua la cual se preparó previamente en una charola con perforaciones. Se presionó la hoja de cartón con los granos sobre el algodón hasta saturarla de agua. Se incubaron a 20 °C por tres días. Al cabo de este tiempo, se contaron los granos germinados, el resultado se expresó como porcentaje de energía germinativa (Rosso y col., 1998).

8.1.6. Capacidad germinativa. Se prolongó la germinación de la muestra usada para determinar energía germinativa por dos días más, al término de este periodo, se contaron los granos germinados. El resultado se expresó como % de capacidad germinativa. Se consideró aceptable un valor mínimo de 85% (Rosso y col., 1998).

8.1.7. Para la determinación de **humedad, proteínas, extracto etéreo y fibra cruda**, se usaron los métodos indicados por el AACC: 44-15A, 46-12, 30-10 y 32-10 respectivamente (AACC, 1983).

8.2. Mantenimiento de cepas.

La cepa de Saccharomyces cerevisiae, fue conservada en Agar Extracto de levadura- Extracto de malta (YM), mientras que la de Lactobacillus plantarum en Agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS). La composición de estos medios se presenta en la Tabla 5.

8.3. Proceso de obtención del tesgüino.

Para la elaboración del tesgüino en el laboratorio, se siguieron las etapas propuestas por Lappe y Ulloa (1989) (Figura 2), en este estudio, las temperaturas y humedades varían de acuerdo al lugar en que se llevó a

cabo el proceso, en inicio se tomaron en cuenta estos valores aunque fueron ajustados para estandarizar el proceso que se realizó. En la Tabla 6 se muestran los valores de temperatura y humedad ambiental y temperatura del sustrato en diferentes etapas del proceso, la variación para una misma etapa, se debe a la hora en que fue tomada la muestra. Los inóculos 1 y 2 corresponden a las cepas de S. cerevisiae y L. plantarum respectivamente.

Tabla 5. Composición de los medios Agar Extracto de Levadura - Extracto de Malta (YM) y Agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

Agar YM		Agar (MRS)	
Extracto de levadura	3g/L	Peptona	10.0 g/L
Extracto de malta	3 g/L	Extracto de carne	8.0 g/L
Peptona	5 g/L	Extracto de levadura	4.0 g/L
Glucosa	10 /L	D-glucosa	20.0 g/L
Agar bacteriológico	20 g/L	Acetato sódico	5.0 g/L
		Citrato triamónico	2.0 g/L
		Sulfato magnésico	0.2 g/L
		Sulfato manganoso	0.05 g/L
		Agar bacteriológico	17.0 g/L
		Polisorbato 80	1 mL/L

(Bioxon)

8.4.Extracción y determinación del contenido de compuestos fenólicos totales. (Velioglu y col., 1998)

El método usado para la determinación de los compuestos fenólicos totales, fue el colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) basado en la reducción química del reactivo que es una mezcla de tungsteno y óxido de molibdeno, los productos de esta reducción tienen color azul y un máximo de absorbancia en 765 nm. La magnitud de la absorbancia a dicha longitud de onda, es proporcional a la concentración de fenoles (Wrolstad, 1993).

A 200 mg de muestra molida, se adicionaron 2 mL de solución de metanol al 80% conteniendo 1% de ácido clorhídrico (solución extractora), la mezcla se agitó a 200 rpm a 20 °C, al término de este tiempo, se traspasó la mezcla a tubos para microcentrífuga y se centrifugó a 4500Xg por 15 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante colocándolo en frascos cubiertos de la luz, el sedimento se resuspendió en otros 2 mL de solución extractora y se repitieron las operaciones anteriores. Se decantó el segundo sobrenadante en el mismo frasco y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. A 100 µL del extracto crudo obtenido, se adicionan 0.75 mL de reactivo de Folin Ciocalteu (Diluido 1:10 con agua destilada), la mezcla se dejó reaccionar

durante 5 minutos en oscuridad, posteriormente se adicionaron 0.75 mL de solución de bicarbonato de sodio (solución de 60g/L). Al cabo de 90 min de reacción a 22 °C, se registró la absorbancia a 725 nm. El resultado se interpoló en una curva tipo de ácido ferúlico y se expresó como equivalentes de ácido ferúlico.

Tabla 6. Temperatura y humedad (H.R.) ambientales, y temperatura del sustrato al momento de tomar las muestras de las diversas fases de elaboración y fermentación del tesgüino.

Fase del proceso	Temp. y H.R. ambientales		Temp. Del sustrato
	°C	%	8 °C
Remojo del maíz	16.0	38	21.7
"	15.5	38	21.1
"	16.7	36	17.8
Remojo y germinación del maíz	20.0	38	18.9
"	29.4	27	22.2
Germinación del maíz	20.0	26	19.0
"	28.5	28	22.0
"	20.3	29	19.0
"	16.2	38	18.0
"	23.3	34	21.1
Molienda del maíz y cocción de la malta	15.6	38	21.1
Enfriamiento y colado del atole	17.2	37	30.0
Mezcla del atole con la liga	20.0	32	21.7
Fermentación del atole	16.7	38	20.5
Tesgüino de 20 horas de fermentación	19.5	50	17.8
Mezcla del tesgüino con atole nuevo	21.0	38	18.9
Tesgüino de 30 horas de fermentación	22.7	30	20.0
Tesgüino de 36 horas de fermentación	20.5	33	19.4
Tesgüino de 50 horas de fermentación	21.5	33	20.6

^a Todas las fases de elaboración y fermentación del tesgüino se realizaron en el interior de una habitación, excepto la cocción de la malta y el enfriamiento y colado del atole, que se efectuaron a la intemperie.

^b No determinada.

8.5. Curva tipo de ácido ferúlico. (Cornejo, 2003)

Se realizó la curva tipo de ácido ferúlico considerando el valor intermedio de la absorbancia a 725 nm leída para la serie de datos que se obtuvo en la determinación de fenoles totales. Se realizó una solución denominada "solución madre". Ésta corresponde al valor más alto de ácido ferúlico y por tanto se llevaron a

cabo diluciones para obtener valores de concentraciones decrecientes. Las diluciones se realizaron utilizando como disolvente la mezcla de extracción correspondiente (metanol acidificado) y el estándar de ácido ferúlico.

8.6 Curva tipo de ácido gálico.

Se realizó la curva tipo de ácido gálico considerando el valor intermedio de la absorbancia a 725 nm leída para la serie de datos que se obtuvo en la determinación de fenoles totales. Se realizó una solución denominada “solución madre”. Ésta corresponde al valor más alto de ácido ferúlico y por tanto se llevaron a cabo diluciones para obtener valores de concentraciones decrecientes. Las diluciones se realizaron utilizando como disolvente la mezcla de extracción correspondiente (metanol acidificado) y el estándar de ácido gálico.

8.7 Extracción de antocianinas y determinación del contenido de antocianinas totales (Abdel-Aal y Hucl, 1999).

No hay métodos satisfactorios de extracción con disolventes para todas las clases de antioxidantes y compuestos fenólicos de alimentos o para clases específicas de estos componentes. Esto es debido a la naturaleza química de dichas sustancias las cuales varían desde estar en forma simple hasta altamente polimerizadas (Al-Farsi y col., 2005).

Wilkinson y col. 1977 comenzaron a extraer antocianinas usando metanol con pequeñas cantidades de HCl (Nollet, 1996). La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirven para mantener un pH bajo. Éste puede, sin embargo, alterar la forma nativa del complejo de pigmentos rompiendo asociaciones con metales, copigmentos y proteínas. Para obtener antocianinas lo más naturalmente posible, se ha recomendado el uso de disolventes neutros (por ejemplo, 60% metanol, etilenglicol, *n*butanol, acetona) y ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico, ácido acético) (Jackman y Smith, 1992). García-Viguera y col. (1998), usaron un método para la extracción de antocianinas con acetona y al final del proceso acidificaban el extracto con agua acidificada (ácido fórmico al 3%) (García y col., 1998).

En un matraz Erlenmeyer, protegido de la luz, se colocaron 500 mg de muestra, se le agregaron 60 mL de solución alcohólica acidificada (Etanol al 95% y HCl 1 N, mezcladas en proporción 85/15 respectivamente) y se ajustó el pH a 1.0 con HCl 1 N. Posteriormente, se agitó a temperatura de 20 °C a 200 r.p.m. durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de extracción, la muestra se colocó en un tubo protegido de la luz y se

centrifugó a 4° C durante 45 minutos a 3280 X g; el sobrenadante final se separó por decantación y se llevó a un volumen de 100 mL en matraz aforado, utilizando para ello solución alcohólica acidificada (Etanol al 95% y HCl 1 N, mezcladas en proporción 85/15 respectivamente). Se midió la absorbancia a 535 nm para cada una de las diluciones anteriores y se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de Antocianinas Totales (Acy Tot) en la muestra de maíz:

$$\text{AcyTot} = \left(\frac{A}{\epsilon} \right) \left(\frac{\text{Vol}}{1000} \right) \text{MW} \left(\frac{1}{\text{Pesode lamuestra}} \right) 10^6$$

Donde:

$$\text{AcyTot} = \text{concentración total de antocianinas} \left[\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right]$$

A= absorbancia media

ϵ = absortividad molar (cianidina β -glucósido = 25965 cm⁻¹M⁻¹)

MW= peso molecular de la cianidina 3-glucósido=449 g/mol

Vol= volumen final de la solución

8.8 Actividad de secuestro de radicales libres.

El desarrollo de la evidencia epidemiológica del papel que desempeñan alimentos antioxidantes en la prevención de ciertas enfermedades ha permitido desarrollar un gran número de ensayos para determinar la capacidad antioxidante, estos métodos pueden estar basados en el secuestro del radical peroxilo (ORAC, TRAP), secuestro del radical hidroxilo (prueba de la desoxirribosa), secuestro de radicales orgánicos (ABTS, DPPH, FRAP), cuantificación de productos orgánicos formados durante la lipoperoxidación (TBARS, oxidación de LDLs), etc.. De todos estos métodos, el método del el 2,2'-azinobis 3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS) o TEAC está basado en la capacidad de los antioxidantes para secuestrar el catión de larga vida ABTS⁺. Este secuestro produce una disminución en la absorbancia a 658 nm. Las lecturas de absorbancia de la mezcla del radical y el antioxidante a diferentes tiempos son representadas gráficamente. Se han introducido cierto número de pruebas para medir la capacidad antioxidante de fluidos corporales (Miller y col., 1993), extractos de alimentos (Emmons y col., 1999; Adom y Liu, 2002; Kang y Saltveit, 2002), plantas medicinales (Katsube y col., 2004; Cai y col., 2004) y compuestos puros (Sarma y col., 1997; Kähkönen y Heinonen, 2003). Cada

método hace referencia a la formación de un radical diferente los cuales actúan a través de gran variedad de mecanismos y la medición de un intervalo o punto final a un tiempo determinado.

La mayoría de los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante consisten en acelerar la oxidación de un sistema lipídico, usualmente por calor, registrar o monitorear el consumo de oxígeno, la pérdida de sustrato o la formación de productos (Fukumoto y Mazza, 2000). En la Tabla 7, se muestran diversas técnicas usadas para la determinación de actividad antioxidante por diferentes autores.

Ya que son muchos los factores que afectan la oxidación entre los que se incluyen temperatura, presión de oxígeno, catálisis por metales, composición de las grasas y forma de las grasas, los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de oxidación usadas. Los resultados para medir los sustratos o los productos pueden también variar dependiendo de su especificidad (Fukumoto y Mazza, 2000).

Osawa y Shibamoto (1992) desarrollaron un método usando HPLC (High-performance-liquid-chromatography) para medir el malonaldehído formado en sistemas de emulsión lipídica oxidados por $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$. El malonaldehído se derivó de la reacción con urea bajo condiciones ácidas para formar 2-hidroxipirimidina, la cual puede ser medida por HPLC. Tsuda y col. (1994) usaron este método para medir el malonaldehído formado en diversos sistemas lipídicos.

Debido a que el método de HPLC es específico para malonaldehído, puede ser una buena prueba para determinar actividad antioxidante de sistemas lipídicos (Fukumoto y Mazza, 2000).

Los métodos relacionados con la oxidación pueden ser tardados dependiendo de las condiciones usadas, mientras que la decoloración de β -caroteno y compuestos que reaccionan con radicales libres son métodos rápidos y simples para medir la potencial actividad antioxidante. Marco (1968), describe el uso de la decoloración de β -caroteno para ordenar o ponderar compuestos de acuerdo su actividad antioxidante. En este método, la actividad es medida por la capacidad de un compuesto para minimizar la pérdida de β -caroteno durante la oxidación acoplada de ácido linoleico y el β -caroteno en un sistema acuoso emulsificado. La reacción es usualmente iniciada con calor (50 °C). Aunque este método es simple y sensible, ha sido criticado por su falta de especificidad, estando sujeto a la interferencia de agentes reductores y oxidantes presentes en los extractos crudos, además el ácido linoleico no es representativo de los lípidos típicos de los alimentos (Fukumoto y Mazza, 2000). Se han usado dos

radicales libres para determinar la actividad antioxidante, estos son: (ABTS⁺) y el 2,2-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), también conocido como 1,1-difenil-2-picrilhidracilo o α,α -difenil- β -picrilhidracilo (Fukumoto y Mazza, 2000).

Tabla 7. Técnicas para la determinación de actividad antioxidante usadas por diversos autores.

AUTOR Y AÑO	TÉCNICA
AL FARSI, 2005	ORAC (FLUORESCENCIA)
AMAROWICZ, 2000	SISTEMA B-CAROTENO-LINOLEATO Y DPPH
BAGCHI, 2003	ORAC
BANDONIENE, 2002	DPPH
BAO, 2005	DPPH Y ABTS
BLANDO, 2004	ORAC
BORKOWSKI, 2005	ABTS (TEAC)
CAI, 2005	ABTS
CHAILLOU, 2006	DPPH
CEBALLOS, 2003	DPPH
DE BEER, 2006	ABTS
DA PORTO	DPPH
DEL POZO, 2006	ORAC
DEWANTO, 2002	TOSC (OXIRADICAL)
ESPIN, 2000	DPPH
DYKES, 2005	DPPH Y ABTS
FUKUMOTO, 2000	DPPH (MICROPLATE)
HAGERMAN, 1998	ABTS (METAMIIOGLOBINA)
HENRIQUEZ, 2004 Y 2002	ABTS
HUANG, 2006	FRAP
HUKKANEN, 2006	DPPH Y FRAP
KANG, 2002	DPPH
KAHKONEN, 2003	DPPH
KIM, 2002	ABTS
KATSUBE, 2004	DPPH
LATTÉ, 2004	DPPH
LAPIDOT, 1999	OXIDACIÓN LIPÍDICA
LEE-WON, 2003	DPPH Y ABTS
LOHACHOOMPOL, 2004	DPPH
NIELSEN, 2003	FRAP Y TEAC
NIWA, 2001	TBARS EN MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE CONEJO
PARRY, 2002	DPPH
PEDRESHI, 2006	DPPH
PÉREZ, 2000	ABTS
PÉREZ, 2006	DPPH, FRAP Y ABTS
PILJAC, 2005	DPPH
POLACHIRA, 2004	DPPH

Tabla 7. Continuación...

AUTOR Y AÑO	TÉCNICA
ROMERO, SÁNCHEZ, 2003	ÁCIDO LINOLEICO ORAC
SCAMPICCHIO, 2006	NANOTUBOS DE ORO
SERRANO, 2007	FRAP, ABTS, "IN VIVO"
SHIMOJI, 2002	DPPH
SOLOMON, 2006	ABTS

En la Tabla 8 se muestran las condiciones de experimentación de las técnicas usadas en este trabajo (DPPH, ABTS y FRAP) según diversos autores.

8.8.1 Determinación de la actividad de secuestro de radicales libres mediante la técnica de DPPH (Fukumoto y Mazza, 2000).

Se basa en la reducción de DPPH^{\bullet} por un antioxidante ($\text{DPPH}^{\bullet} + \text{A} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$) o por especies de radicales ($\text{DPPH}^{\bullet} + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPH-R}$) lo cual resulta en una pérdida de absorbancia a 515 nm. Brand-Williams y col. (1995), usando DPPH^{\bullet} desarrollaron un método espectrofotométrico que da resultados similares a los métodos de oxidación, pero las comparaciones no fueron cuantitativas debido a que la reacción con DPPH depende de la conformación estructural de los compuestos (Fukumoto y Mazza, 2000).

Fukumoto y Mazza (2000) mencionan que en muchas ocasiones en los ensayos de actividad antioxidante, los sustratos o productos son monitoreados por mucho tiempo y la efectividad de un antioxidante a determinada concentración es determinada por el tiempo requerido para alcanzar cierto nivel de sustrato o producto, sin embargo, monitorear la oxidación con respecto al tiempo es muy tardado e impráctico cuando se tienen muchas muestras por lo que proponen el uso de tiempos de reacción fijos.

El método del DPPH mide sólo la reacción de un compuesto con el DPPH^{\bullet} la cual es dependiente de su conformación estructural y por tanto las comparaciones no son siempre adecuadas.

En esta técnica se evalúa la capacidad de las antocianinas y los fenoles para secuestrar al radical DPPH lo que ocasiona una disminución en la absorbancia, a mayor capacidad antioxidante del componente en estudio, la disminución en la absorbancia será más pronunciada. La técnica consistió en mezclar 1950 μL de solución 0.5 mM de DPPH en etanol, en una celda espectrofotométrica a la que

previamente se le adicionaron 50 μ L de extracto de muestra (2 g de muestra fueron extraídos con 20 mL de etanol absoluto), se detectó la absorbancia al tiempo cero y a los 30 minutos a 517 nm. El resultado se expresó como porcentaje de secuestro de radicales libres al ser comparado con un testigo (sin capacidad antioxidante).

8.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la técnica de ABTS (Re y col., 1999).

Actualmente el método ABTS se ha usado ampliamente tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable (Antolovich y col., 2002). El radical ABTS \bullet + una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) (Miller y Rice, 1997) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl] (Re y col., 1999), pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm (Robards y col., 1999). El radical ABTS \bullet + es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además el radical generado químicamente (persulfato potásico) desarrollado por Re y col. (1999), se validó por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente al método anteriormente descrito (Miller y Rice, 1997).

La técnica consistió en mezclar 1950 μ L de solución de ABTS $^+$ (preparado haciendo reaccionar 10 mL de ABTS 7 mM y 10 mL de K₂S₂O₈ 2.45 mM por 24 h en ausencia de luz) en una celda espectrofotométrica a la que previamente se le adicionaron 50 μ L de extracto de muestra (2 g de muestra fueron extraídos con 20 mL de etanol acidificado), se detectó la absorbancia al tiempo cero y a los 10 minutos a 734 nm. El resultado se expresó como porcentaje de secuestro de radicales libres al ser comparado con un testigo (sin capacidad antioxidante).

Tabla 8. Condiciones de experimentación usadas por diversos autores en las técnicas aplicadas en este trabajo.

DPPH									
AUTOR	[DPPH]	Cantidad de DPPH ⁺	Solvente	Cantidad de muestra	Otro solvente	Cantidad de otro solvente	Longitud de onda	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
AMAROWICZ, 2000	1mM	0.25 mL	-----	0.1 mL	agua	2 mL	517 nm	-----	30 min
BANDONIENE, 2002	6x10 ⁻⁵ M	2 mL	metanol	50 µL	-----	-----	515 nm	-----	1 min
BRAND-WILLIAMS, 1995	6x10 ⁻⁵ M	3.9 mL	metanol	0.1 mL	-----	-----	515 nm	-----	15 min c/1 min y c/15 min desp.
CHAILLOU, 2006	Abs. = 1	3 mL	metanol	20µg	-----	-----	517 nm	-----	70 min
BAO, 2005	60 µM	3.9 mL	-----	0.1 mL	-----	-----	515 nm	-----	6 h
CEVALLOS, 2003	98.9 µM	2850 µL	metanol	150 µL	-----	-----	515 nm	-----	20 h (c/15 min)
DA PORTO, 2000	6x10 ⁻⁵ M	3 mL	metanol	10 µL	-----	-----	515 nm	-----	10 min. (c/min)
ESPIN, 2000	26 µM	-----	-----	-----	-----	-----	515 nm	-----	-----
FUKUMOTO, 2000	150µM	200 µL	Metanol 80%	22 µL	-----	-----	515 nm	-----	-----
HU, 2006	6x10 ⁻⁵ M	3.9 mL	metanol	0.1 mL	-----	-----	515 nm	-----	Varios
HUKKANEN, 2006	10 mg/250 µL meOH	-----	metanol	50 µL	Acetato de sodio 0.5 M pH 5	50µL (para la muestra)	530 nm	-----	-----
KANG, 2002	0.5 mM	0.25 mL	-----	0.5 mL	Buffer de acetatos 100m M pH 5.5	0.5 mL	517 nm	-----	30 min.
KÄHKÖNENE, 2003	0.1mM	2950µL	metanol	50µL	-----	-----	517 nm	-----	4 min.
KIM, 2002	100µM	2.9 mL	Metanol 80%	0.1 mL	-----	-----	517 nm	-----	30 min.
LATTÉ, 2004	9.6x10(-4)M	0.5 mL	metanol	2mL	-----	-----	515 nm	-----	30 min.

Tabla 8. Continuación....

AUTOR	[DPPH]	Cantidad de DPPH ⁺	Solvente	Cantidad de muestra	Otro solvente	Cantidad de otro solvente	Longitud de onda	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
LOHACHOOMPOL, 2004	6x10(-5) mol/L	3.9mL	metanol	0.1 mL	-----	-----	515 nm	-----	2h (c/5 min)
PARRY, 2006	100µM	2 mL tot.	Acetona 50%	2 mL tot.	-----	-----	517 nm	-----	c/20 min
PEDRESHI, 2005	Abs=1.1	2850 µL	metanol	150 µL	-----	-----	515 nm	-----	0-24 h
PHILPOTT, 2004	100µM	150µL	-----	50 µL	-----	-----	-----	-----	-----
PÉREZ, 2006	60µM	0.1 mL	metanol	3.9 mL	-----	-----	515 nm	-----	A estabilizarse
PILJAC, 2005	0.094 mM	1 mL	metanol	20µL	-----	-----	515 nm	-----	60 min.
POLACHIRA, 2004	64µM	-----	metanol	-----	-----	-----	515 nm	-----	30 min (c/10s)
STRATIL, 2004	98 mg/L → abs=1.5	950 µL	metanol	0-50µL	Agua bidest.	0-50µL	515 nm	-----	30 min
WU, 2005	0.1 mM	1000µL	etanol	50µL	Tris-HCl 50 mM pH 7.4	450µL	517 nm	-----	30 min

ABTS

AUTOR	[ABTS]/¿? (tiempo)	Cantidad de ABTS ⁺	Solvente	Cantidad de muestra	Otro solvente	Cantidad de otro solvente	Longitud de onda	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
DE BEER, 2006	[ABTS]/[K ₂ S ₂ O ₈] 7mM-2.5 mM final (24 h)	1 mL	Agua	50µL	-----	-----	734 nm	37°C	4 min

Tabla 8. Continuación....

AUTOR	[DPPH]	Cantidad de DPPH ⁺	Solvente	Cantidad de muestra	Otro solvente	Cantidad de otro solvente	Longitud de onda	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
CAI, 2005	-----	3.9 mL	-----	0.1 mL	-----	-----	734 nm	-----	6 min.
KIM, 2002	[ABTS]/ [AAPH] 2.5 mM/1Mm	-----	PBS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KUSKOSKI, 2004	[ABTS]/ [K ₂ S ₂ O ₈] 7mM-2.45 mM final (16h; T amb)	980μL	Etanol	20μL	-----	-----	754 nm	30°C	1 min.
LEE, 2003	[ABTS]/ [AAPH] 2.5 mM/1mM (68°C 13 min)	980μL	PBS	20μL	-----	-----	734 nm	-----	-----
PÉREZ, 2000	[ABTS]/ [MnO ₂] 100 μM/???	-----	-----	-----	-----	-----	734 nm	-----	15 min
PÉREZ, 2006	[ABTS]/ [K ₂ S ₂ O ₈] 38.4mg - 10mL (66mg/100 mL H ₂ O) (1 noche; ag.)	3.9 mL	Agua	100μL	-----	-----	-----	-----	6 min (c/20s)

Tabla 8. Continuación....

AUTOR	[DPPH]	Cantidad de DPPH ⁺	Solvente	Cantidad de muestra	Otro solvente	Cantidad de otro solvente	Longitud de onda	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
SERRANO, 2007	[ABTS]/ [K ₂ S ₂ O ₈] 7mM-2.45 mM final (16h; T amb)	3.9 mL	PBS (para dil. Abs=0.7± 0.02)	0.1 mL	-----	-----	730 nm	-----	6 min(c/20s)
STRATIL, 2004	[ABTS]/ [K ₂ S ₂ O ₈] 7mM-4.95 mol/L final 1:1 (12h; T amb)	975μL	Ajustar abs a 1- 1.5 UA	5-25 μL muestra	Agua bidest.	0-20μL	734 nm	----	20 min.
RE, 1999	[ABTS]/ [K ₂ S ₂ O ₈] 7mM-2.45 mM final 1:1 (16h; T amb)	990μL	etanol	10μL	-----	-----	734 nm	----	6 min

8.9 Determinación de ácido láctico.

Para determinar ácido láctico, se titularon 9 mL de muestra (diluida con agua en caso necesario) con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. Se registró el gasto necesario para el obtener un pH de 7 ± 0.05 el % de ácido láctico se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ácido láctico} = G \times N$$

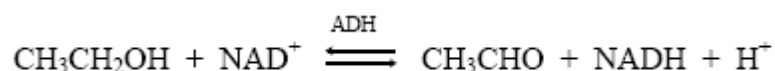
donde:

G = gasto de NaOH

N = normalidad de NaOH (0.1N)

8.10 Determinación de etanol. (Sigma, 2007)

La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), aislada a partir de levadura, es una metaloenzima tetrámera que contiene zinc en el centro activo y que cataliza la oxidación de etanol (y en menor medida de otros alcoholes alifáticos de cadena corta, excepto metanol) por la coenzima nicotinamina adenina dinucleótido (NAD⁺) produciendo NADH y acetaldehído según el siguiente esquema de reacción:



Cuando el NAD⁺, se convierte de a NADH, hay un incremento en la absorbancia a 340 nm el cuál es una buena medida del etanol presente en una muestra determinada.

Ciertos alcoholes altamente alifáticos pueden reaccionar con la ADH. La ADH de levadura es la más activa con etanol y su actividad disminuye conforme el tamaño del alcohol aumenta o disminuye, alcoholes ramificados o secundarios, tienen muy poca actividad, en la Tabla 9 se muestra la reactividad relativa de la enzima ADH con diferentes alcoholes.

La técnica consiste en deproteinizar la muestra colocando en un tubo para centrífuga 1.8 mL de ácido tricloroacético al 6.25% (peso/volumen), y adicionar 0.2 mL de muestra al mismo tiempo que se agita la mezcla vigorosamente; posteriormente la muestra se centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante. Posteriormente se mezclan 0.1 mL de dicho sobrenadante con reactivo NAD-ADH conteniendo 10 μmol de Nicotinamin adenin dinucleótido (NAD) y 850 unidades de alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH) (una unidad de ADH puede convertir 1 μmol de etanol a

acetaldehído por minuto a pH 8.8 a 25°C) previamente disueltos en 16 mL de amortiguador de glicina 0.5M pH 9, la mezcla se agita vigorosamente e incuba 20 minutos a 37 °C en baño de agua. Por último se lee la absorbancia de la muestra a 340 nm contra un testigo preparado en las mismas condiciones pero conteniendo 0.05 mL de ácido tricloroacético y 0.05 mL de agua en lugar de 0.1 mL de muestra. La concentración de etanol se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Alcohol (mg/dL)} = A_{340\text{nm}} \times 223$$

Tabla 9. Reactividad relativa de la enzima ADH con diferentes alcoholes.

SUBSTANCIA	REACTIVIDAD APROXIMADA (%)
Etanol	100
n-Butanol	40
Isopropanol	8
Metanol	0
Etilenglicol	1
Acetona	0

Tomada de Sigma-Ardrich, 2007.

8.11 Obtención de las curvas de crecimiento microbiano

Se realizaron por el método de diluciones, en solución salina al 0.9% las cuales se sembraron en cajas de Petri conteniendo MY y MRS para posteriormente ser incubadas a 30 °C en el caso de las levaduras y a 36°C en el caso de los lactobacilos durante 48 h. Se cuentan las UFC y se calculan por mL de muestra. Además se observó el cambio en el crecimiento microbiano de ambas cepas durante la fermentación del maíz previamente procesado (germinado, molido y cocinado) por separado y en forma conjunta.

8.12 Adquisición de imágenes.





Las imágenes fueron obtenidas de tres granos de maíz diferentes. El criterio para la selección de las semillas es el Diámetro de Feret (longitud mayor) de 100 granos. La toma de la imagen se realizó con una cámara digital de 4.1 mega pixeles que se fijó a un soporte metálico, en el dispositivo se colocó una hoja de

papel milimétrico en el fondo como referencia. Las imágenes así obtenidas fueron descargadas en una computadora personal y analizadas con el programa Image J de dominio público.

8.13 Análisis de imagen y cálculo de dimensión fractal.

Se tomaron imágenes a diferentes tiempos de germinación con una cámara digital conectada a su vez a una computadora personal que cuenta con un programa de captura de imagen, la imagen digitalizada, fue almacenada en formato de mapas de bits y a partir de ella se determinó la dimensión fractal de la superficie por medio del método de Conteo de Cajas. El método consiste en la determinación de perímetros o áreas de una imagen usando un algoritmo de geometría cuadrangular (caja o celda) de diferentes tamaños con el cual se mide el perímetro o área que ocupa el objeto. Los valores obtenidos del número de cajas o celdas (N_r) contra el tamaño de la caja (r) se representan en un gráfico logarítmico, la pendiente de este gráfico proporciona la dimensión fractal (Chanona, 2004).

El proceso de análisis se describe a continuación:

Imagen original.	
Se aísla la imagen del fondo usando la herramienta "Polygon selections" y la selección: "Edit" ↵ "Clear outside" ↵	
Se ajusta en contraste de la imagen: "Image" ↵ "Adjust" ↵ "Brightness/Contrast" ↵ Hasta un valor de 249	
Se convierte a imagen de 8 bits: "Image" ↵ "Type" ↵ "8-bit" ↵	

Se segmenta la imagen:

“Image” ↵

“Adjust” ↵

“Threshold” ↵

Hasta un valor de 85



De esta forma se obtiene una imagen donde el área cuantificable está en color negro, por lo que se tiene que invertir:



“Edit” ↵

“Invert” ↵

A partir de esta imagen se realiza la medición de:

Escala: usando como referencia el papel milimétrico, se fija una escala de 308 pixeles : 1 cm

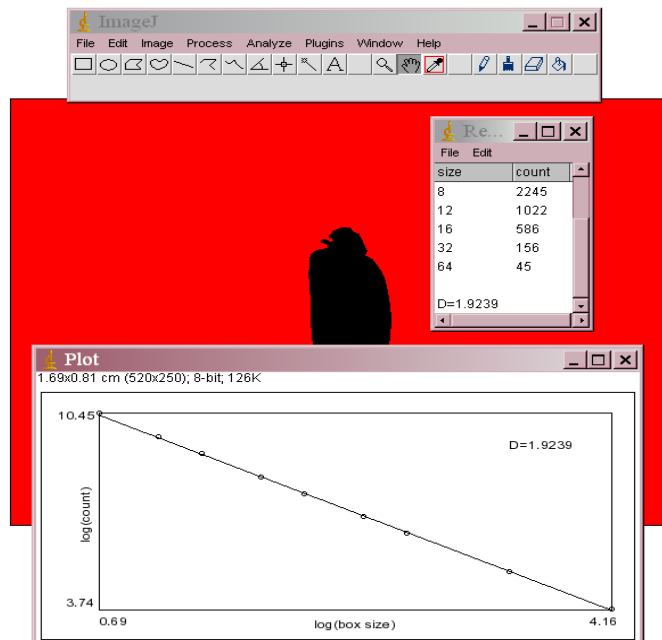
“Analyze” ↵

“Set Scale” ↵

Área y diámetro de Feret:

“Analyze” ↵

“Analyze particles” ↵



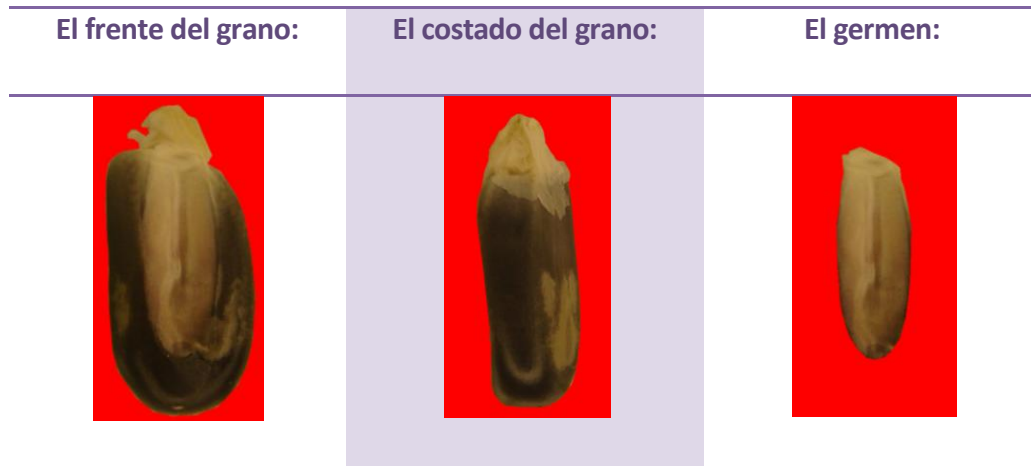
Dimensión fractal del área:

Analyze ↵

Tools ↵

Fractal Box Count

De esta forma se obtuvieron los datos correspondientes a:



8.14 Determinación de color.

Se determinó el color de las muestras en el Espectrofotómetro-Colorímetro (Milton Roy Color Mate HDS), para ello, en el caso del grano de maíz durante la germinación, la muestra fue molida previamente a la determinación en un molino eléctrico, a partir de la cocción, la muestra fue vertida directamente en una celda de vidrio óptico y se tomaron las medidas con el iluminante C y un ángulo de observación de 10° , de esta forma, se obtuvieron los valores para L^* , a^* , b^* , X, Y y Z de los sistemas CIELAB y CIEXYZ. A partir de estos datos, se calcularon C, H, λ complementaria y ΔE , los primeros mediante las fórmulas correspondientes y la λ por medio de un diagrama cromático.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Caracterización del maíz azul usado como materia prima.

Se adquirieron 7 Kg de maíz azul criollo en la población de San Mateo Tepopula localizada en el estado de México, dicho maíz cosechado en el mes de diciembre de 2004 provino de los cultivos pertenecientes al Sr. Francisco Mendoza habitante de esta población.

En la Tabla 10 se muestran las características generales del maíz usado en este trabajo así como los correspondientes a maíz blanco del mismo origen.

Tabla 10. Comparación de los valores obtenidos de peso hectolítrico, viabilidad del grano, energía germinativa, capacidad germinativa y humedad de maíz azul y maíz blanco originarios de S.M. Tepopula, Edo. Mex.

Determinación	Maíz Azul	Maíz Blanco
Impurezas (%)	2.3%	1.1%
Aspecto	Limpio, entero, con escasos granos rotos.	Limpio, con escasos granos rotos y color uniforme.
Peso hectolítrico (Kg/HL)	70.44	78.6
Viabilidad del grano (%)	92	92
Energía germinativa (%)	70.4	77
Capacidad germinativa (%)	93	98
Humedad (%)	13	12

En general, los parámetros observados fueron los siguientes:

Impurezas. Se define como impurezas a los pedazos de maíz y toda materia extraña que acompaña a la semilla. Estas impurezas que incluyen el material fino (pedazos de endospermo), promueven el desarrollo de insectos y hongos en el maíz por ser un sustrato más disponible que el grano entero (González, 1995). La NMX-FF-034/1-SCFI-2002, especifica 3 grados de calidad del maíz de acuerdo a diferentes aspectos entre los que se encuentran el porcentaje de impurezas, de acuerdo a dicha norma, el maíz blanco (1.1%) se ubica en el nivel de calidad más alto (grado 1) cuyo máximo de impurezas es de 2%, mientras que el azul se ubica en el grado 2 que permite como máximo 2.5%.

Aspecto. El grano fue de aspecto limpio, entero, con escasos granos dañados y sin contaminación de otras semillas.

Peso hectolítrico. Se realizó la prueba por triplicado, obteniéndose un valor de peso por hectolitro de 70.44 el cuál es similar a los reportados por Salinas y col. (2003) que obtuvieron 71.2 Kg/HL para maíz Chalqueño, 75.2 para maíz Azul cristalino de Chihuahua y 74.9 para maíz bolita. De acuerdo con De Dios (1996), los granos secados de forma tradicional alcanzan un peso hectolítrico de hasta 81 Kg/HL mientras que valores cercanos a 70 Kg/HL son características de granos secados industrialmente; por otro lado, la NMX-FF-034/1-SCFI-2002 establece que los granos de maíz destinados a la elaboración de tortillas deberán tener un peso hectolítrico mínimo de 74 Kg/HL para ser considerados de buena calidad. El peso hectolítrico está relacionado con la dureza del grano, cuanto mayor sea este valor, mayor es la dureza, en el caso del obtenido en este estudio, es característico de maíces de endospermo suave (Salinas y col., 2003).

Viabilidad del grano. La respiración aeróbica incluye la eliminación de electrones o átomos de hidrógeno desde ciertos metabolitos intermediarios, y su transferencia al oxígeno para formar agua. Este proceso de oxidación libera gran cantidad de energía, parte de la que queda en el ATP, la eliminación de electrones es catalizada por varias enzimas deshidrogenasas. Estas enzimas además pueden transferir electrones a ciertos compuestos orgánicos que no se encuentran en las células vivas, como por ejemplo el cloruro de 2,3,5- trifenil tetrazolio que se reduce por la acción de las deshidrogenasas y cambia de un material sin color a un pigmento rojo llamado trifenil formazán, de esta forma puede evaluarse la actividad de las deshidrogenasas en varios tejidos, de forma teórica, las células muertas son incapaces de respirar por que no tienen actividad de deshidrogenasas y no se produce el pigmento rojo. Se considera como normal una viabilidad del 10% al 85%, regular entre 84% y 75% , mediana de 70% a 50% y mala cuando es menor a 49% (González, 1995). Se realizó por triplicado el experimento, obteniéndose 92% de granos viables (rojos), 8% de granos con baja viabilidad (rosas) y no se encontraron granos muertos por lo que la viabilidad se interpreta como normal, sin embargo la prueba tiene que complementarse con los valores de energía y capacidad germinativa para considerarse fiable.

Energía germinativa. Se determinó por triplicado obteniéndose un valor de 70.4%.

Capacidad germinativa. Fue de 93% al realizarse la prueba por triplicado; este valor es aceptable pues es mayor del 85% propuesto por Rosso y col. (1998) Además, es coincidente con los valores de viabilidad observados.

En la Tabla 8 se muestran los valores para las determinaciones anteriores de maíz azul comparadas con las obtenidas para maíz blanco obtenido de la misma fuente, se observa un valor mayor de peso hectolítrico que si cumple con la NMX-FF-034/1-SCFI-2002; el valor de capacidad germinativa, es mayor para el maíz blanco que para el maíz azul, lo cual al igual que el peso hectolítrico está relacionada con la temperatura de secado del maíz y su calidad. En el caso de viabilidad del grano, energía germinativa y humedad, los valores son muy cercanos entre uno y otro maíz.

En la Tabla 11 se muestra el análisis químico proximal del mismo comparadas son las reportadas por otros autores.

Tabla 11. Comparación de la composición del grano de maíz usado en este trabajo con algunos otros reportados en la literatura.

	Maíz Azul usado en este estudio	Maíz Azul Cuijingo 2*	Elotes Chalqueños**	Maíz promedio***
Humedad (%)	13	10.5	12.2	12.5
Proteína (%)	7.6	6.7	---	8.9
Grasa (%)	5.3	4.4	---	4.3
Fibra Cruda (%)	2.6	2.0	---	---
Carbohidratos (%) ****	71.5	76.4	---	72.2

*Cornejo, 2003

** Salinas y col., 2003

*** Solis, 1998

**** Cantidad obtenida por diferencia

Se puede observar que los valores obtenidos en el análisis químico proximal son muy cercanos a los reportados por diversos autores, en el caso de la humedad, grasa y fibra cruda, se observa que los valores son un poco más altos en comparación con las referencias citadas, mientras que la proteína se sitúa en un valor intermedio.

Según González (1995), para fines prácticos de almacenamiento, no se debe permitir que el contenido de humedad de los granos almacenados rebase el valor del contenido de humedad en equilibrio con

una humedad relativa de 70% que para maíz corresponde a 13.5%, en el caso de los maíces estudiados en el presente trabajo, ambos cumplen con dicha característica. La NMX-FF-034/1-SCFI-2002 establece un valor de 14% máximo.

Por otro lado, se determinó la cantidad de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante del maíz sin procesar, en la Tabla 12 se muestran dichos valores comparados con los obtenidos para maíz blanco.

La cantidad de antocianinas en maíz blanco es muy baja, mientras que las cantidades encontradas para maíz azul, corresponden de forma aproximada a lo reportado por Sanchez y col. (2003) quienes encontraron valores desde 3.5 hasta 77.9 mg / 100g de maíz pigmentado de diversos tipos y orígenes y por (Cornejo, 2003) quien reportó un valor de 58 mg/100g de maíz azul Cuijingo 2.

Tabla 12. Comparación de la cantidad de antocianinas y compuestos fenólicos totales de maíz azul y blanco originarios de S.M. Tepopula, Edo. Mex.

Determinación	Maíz Azul	Maíz Blanco
Antocianinas (mg cianidina-3-glucosa / 100g de maíz)	53.94	1.03
Fenoles totales		
Como mg ác. Gálico/ 100 g de maíz.	84.57	96.80
Como mg ác. Ferúlico/ 100 g de maíz	152.77	174.07

9.2. Determinación de las condiciones de germinación más adecuadas.

Para determinar las condiciones de germinación más adecuadas, se tomaron en cuenta las condiciones reportadas por Lappe y col. (1989) quienes hicieron observaciones de la elaboración de tesguino en una comunidad Tarahumara de Chihuahua, con base en las condiciones ambientales descritas por ellos, se decidió elaborar un diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi usando el programa de cómputo Design Expert 7.0 (Stat Ease, 2005). Se tomaron en cuenta cuatro parámetros con tres niveles que se muestran en la Tabla 13.

El programa arrojó un diseño de 9 experimentos bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 14. En todos los casos la respuesta fue el porcentaje de germinación de los granos, en la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13. Parámetros y niveles tomados en cuenta para determinar las condiciones óptimas de germinación de maíz azul por medio de un diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi.

PARÁMETRO	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
A Tiempo de remojo	24h	248h	72 h
B Cantidad de agua de remojo	100agua/ 100 g de maíz	200agua/ 100 g de maíz	400 mL agua/ 100 g de maíz
C Temperatura de germinación	20°C	25 °C	30 °C
D Tiempo de germinación	24 h	48 h	96 h

Tabla 14. Serie de experimentos elaborados de acuerdo al diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul.

EXPERIMENTO	A	B	C	D
1	3	2	1	3
2	1	1	1	1
3	2	1	2	3
4	1	3	3	3
5	3	3	2	1
6	2	3	1	2
7	1	2	2	2
8	2	2	3	1
9	3	1	3	2

Donde:			1	2	3
A	Tiempo de remojo	(h)	24	48	72
B	Cantidad de agua de remojo	(g de agua/ 100 g de grano)	100	200	400
C	Temperatura de germinación	(°C)	20	25	30
D	Tiempo de germinación	(h)	24	48	96

Al evaluar los valores en el programa, se obtuvo un nivel igual de importancia para los cuatro parámetros estudiados y una serie de 81 combinaciones de dichos factores de los cuales seis tuvieron un nivel de conveniencia de 1 (Tabla 16) y uno de ellos un porcentaje de germinación predicho de 90.6%, dicha combinación se refiere a **24 h de remojo del grano, 200g de agua por cada 100g de grano, temperatura de 25 °C y 96h de totales de germinación**, al ser evaluados estos parámetros experimentalmente, se obtuvo un porcentaje de germinación de 94% lo cual corrobora la predicción.

Tabla 15. Resultados obtenidos para el diseño experimental de Matriz Ortogonal de Taguchi para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul.

EXPERIMENTO	% GERMINACIÓN
1	52
2	10
3	74
4	68
5	36
6	44
7	76
8	34
9	30

Tabla 16. Combinaciones de factores obtenidos para la optimización de las condiciones de germinación de maíz azul con un nivel de conveniencia de 1.

Número	A	B	C	D	% Germinación	Conveniencia
1	1	2	2	2	76	1
2	1	2	2	3	90.6	1
3	2	2	2	3	90	1
4	3	2	2	3	78.6	1
5	1	3	2	3	86	1
6	2	3	2	3	85.3	1

9.3. Determinación de las condiciones de elaboración del tesgüino en el laboratorio.

La Figura 13 muestra el diagrama de elaboración de tesgüino en el laboratorio, como puede observarse, se tomó como base la preparación tradicional del producto, a éste proceso básico, se le modificaron algunos parámetros de tal forma que se asignaron los valores correspondientes a las condiciones de germinación previamente encontradas, se limitó la flora microbiana a dos microorganismos (Lactobacillus plantarum y Saccharomyces cerevisiae) y se fijó la temperatura de fermentación en 30 °C pues se observó que en las condiciones de experimentación, L. plantarum no crece a temperaturas menores y S. cerevisiae, no resiste temperaturas superiores a 34°C. La razón para estandarizar de esta forma el proceso, fue mantener constantes las condiciones de experimentación durante el desarrollo del presente trabajo.

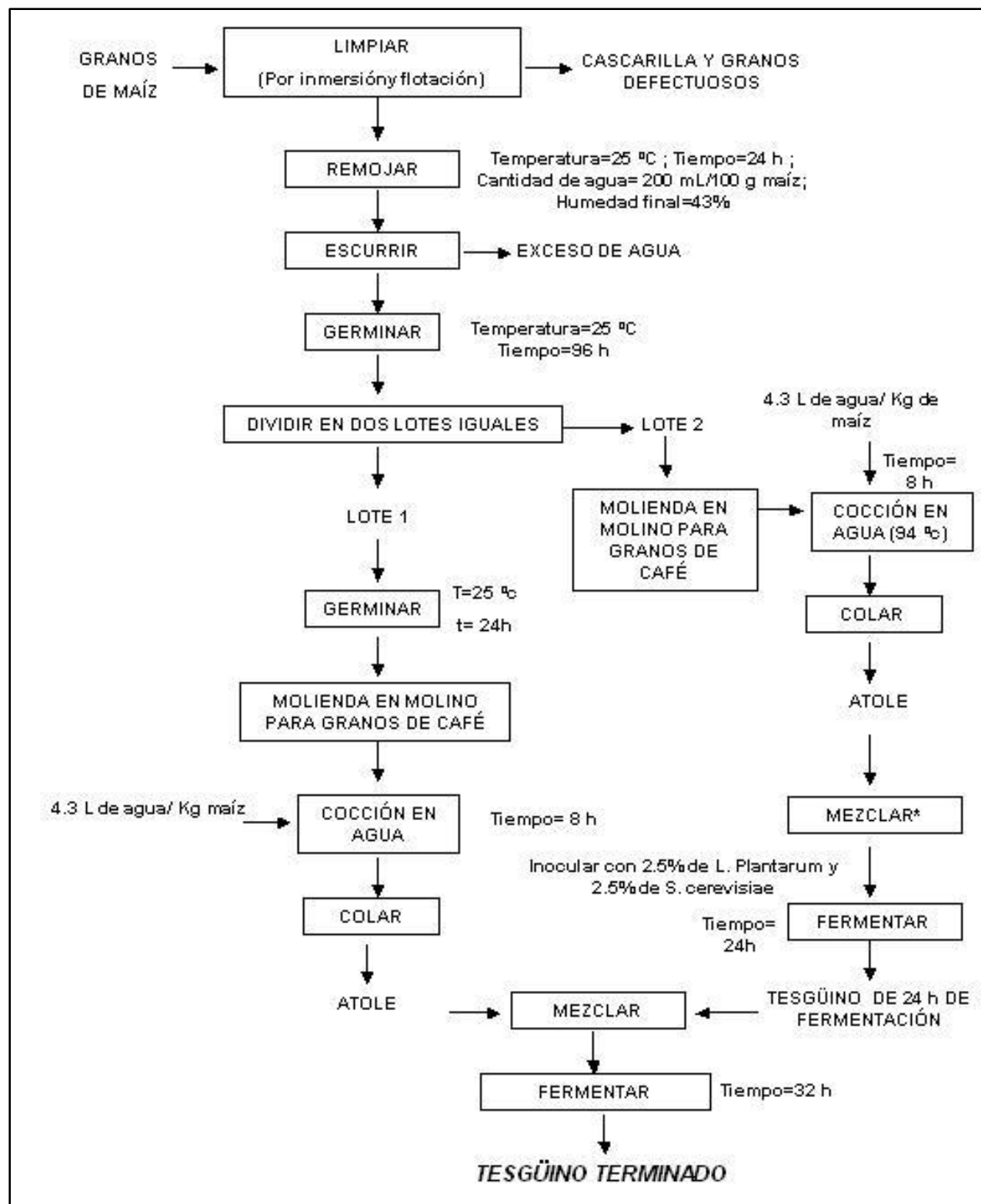


Figura 13. Valores considerados de los parámetros para la elaboración de tesgüino de maíz azul durante este trabajo.

9.4. Cambios de humedad durante el proceso de elaboración del tesgüino.

En las Figuras 14-18 se muestran los gráficos correspondientes a las variaciones de humedad durante las diferentes etapas de elaboración del tesgüino, durante la primera etapa correspondiente a la germinación (Figura 14), la humedad aumenta rápidamente durante las primeras 24 h, periodo de imbibición del grano en que la absorción de agua es mayor, posteriormente, el contenido de agua aumenta a menor velocidad hasta mantenerse prácticamente constante durante las últimas 24h, periodo en que comienza a emerger la radícula, el comportamiento durante las primeras 70 h de germinación, es congruente con lo observado en las fases I y II reportadas por Vázquez y col. (1997) (Figura 4), la fase III, no se observa debido a que en este caso, la germinación no ocurre en condiciones de campo (semilla en tierra) y el aporte de humedad del suelo no existe, la ganancia de humedad en esta etapa del proceso es de 30% aproximadamente.

Los pasos siguientes a la germinación son la molienda y posterior cocción del germinado, el germinado de maíz, se muele y se mezcla con agua (4.3 litros de agua por cada kilogramo de germinado) para someterlo a una cocción a 94°C por 8 horas, durante este proceso, el agua perdida por evaporación es continuamente sustituida de tal forma que la humedad permanece entre 86% y 88% durante todo el proceso, la cocción se realizó en dos lotes, el lote 1 con 120h de germinación y el segundo con 96 (Figura 13). Ya que la mezcla de cocción debe mantenerse constantemente en agitación (para lo que se usó un agitador magnético), mantener constante la humedad fue complicado, por ello, en las Figuras 15 y 16 puede observarse la variación de humedad con respecto al tiempo debidas a diferencias en los volúmenes agregados cada vez.

La última parte del proceso es la fermentación, los cultivos utilizados fueron S. cerevisiae y L. plantarum, cepas NRRL B-12632 y NRRL B-4495. Los microorganismos liofilizados, fueron reactivados en medio YM y medio MRS respectivamente.

Ambas cepas fueron inoculadas al mismo tiempo, al 2.5 % la levadura y al 1% el lactobacilo. La fermentación inicial fue de 24 h, al término de este tiempo, se incorporó en maíz que se dejó germinar 24h más después de ser procesado (cocinado y colado) de la misma manera que la mitad inicial, una vez mezclados ambos lotes, se llevó a cabo una segunda etapa de la fermentación de 32 h obteniéndose el producto final. Durante este proceso, la humedad de la muestra se mantuvo prácticamente constante entre 91 y 92%. (Figura 17)

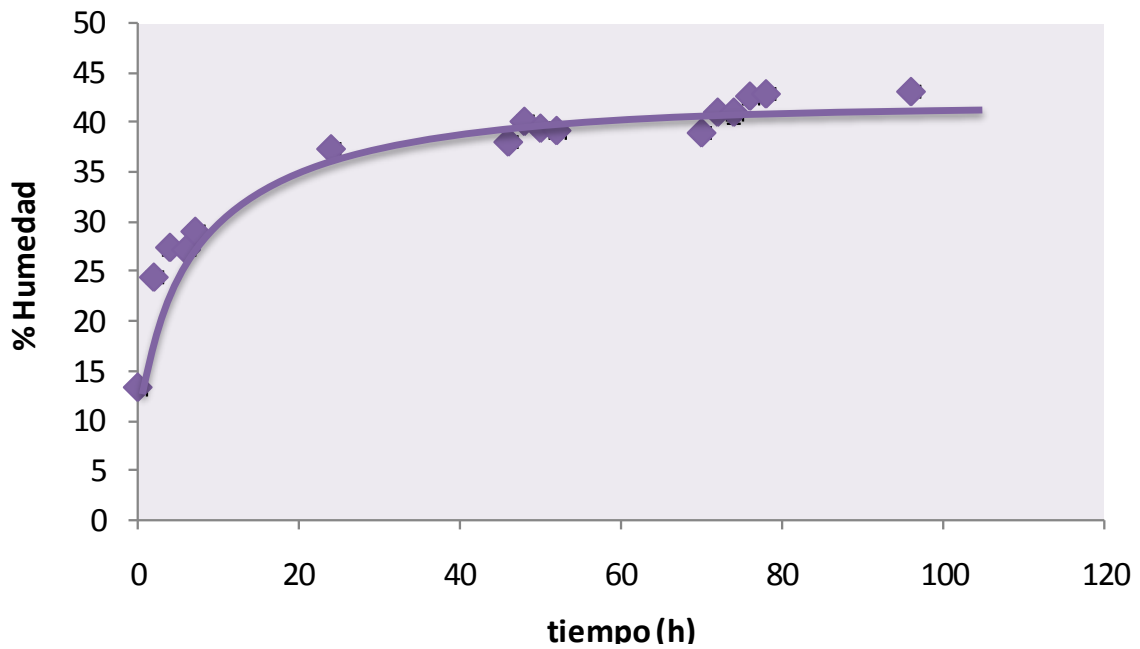


Figura 14. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de germinación de maíz azul para la elaboración de Tesgüino.

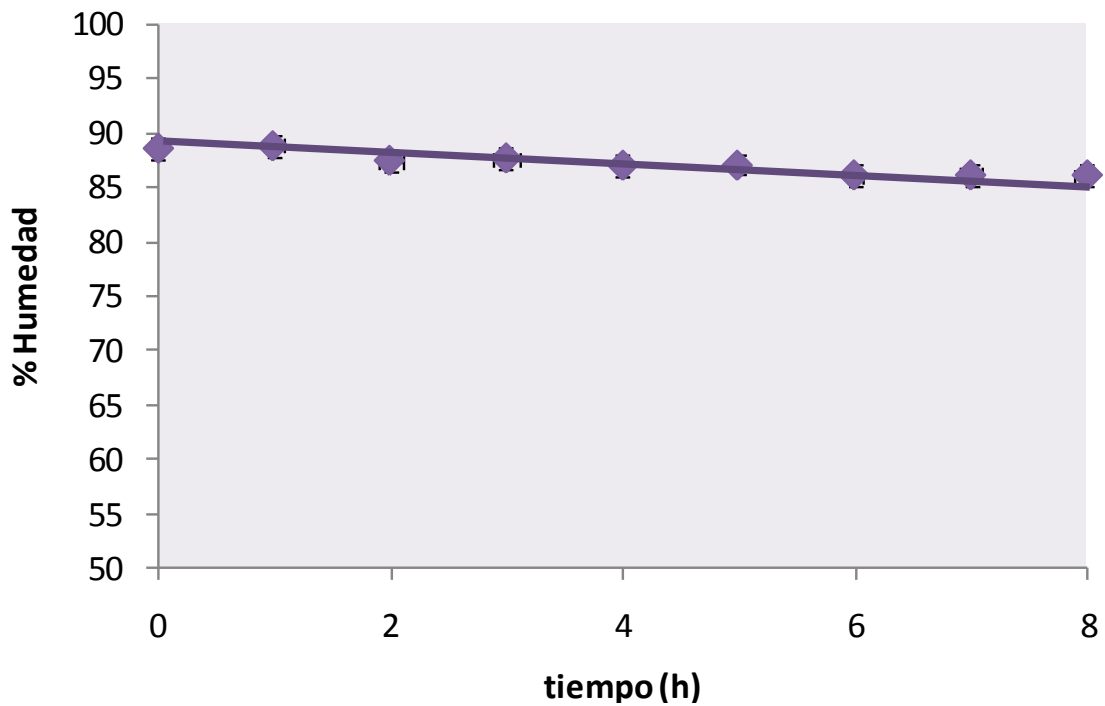


Figura 15. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de cocción del Lote 1 de germinado de maíz azul para la elaboración de Tesgüino.

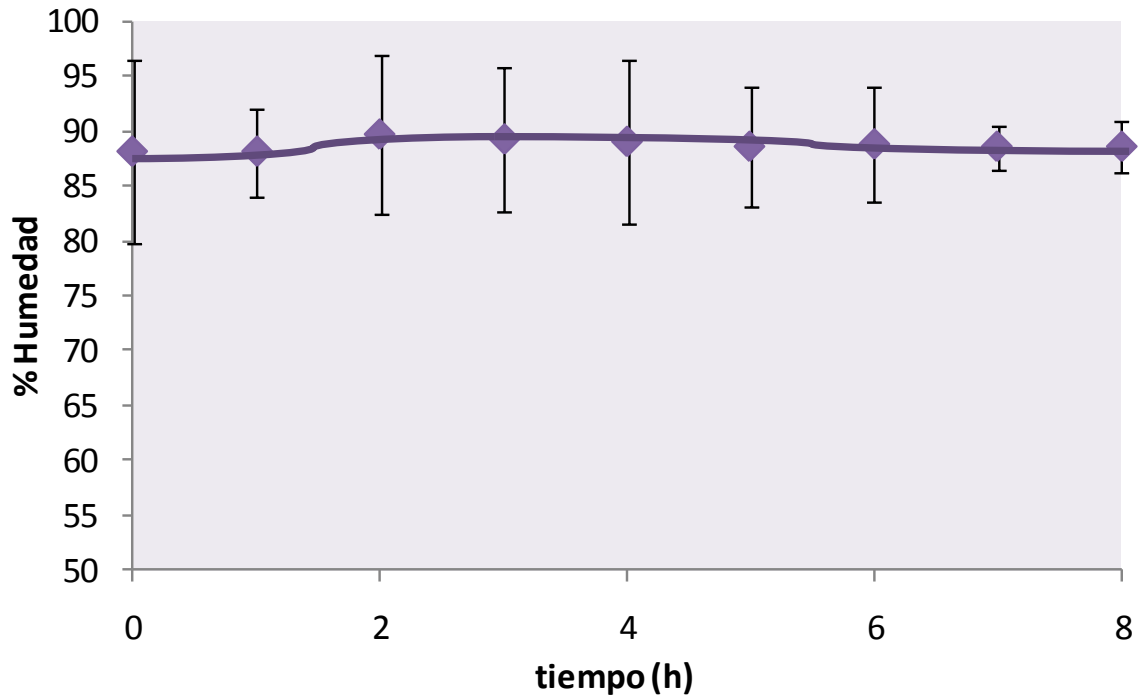


Figura 16. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de cocción del Lote 2 de germinado de maíz azul para la elaboración de Tescüino.

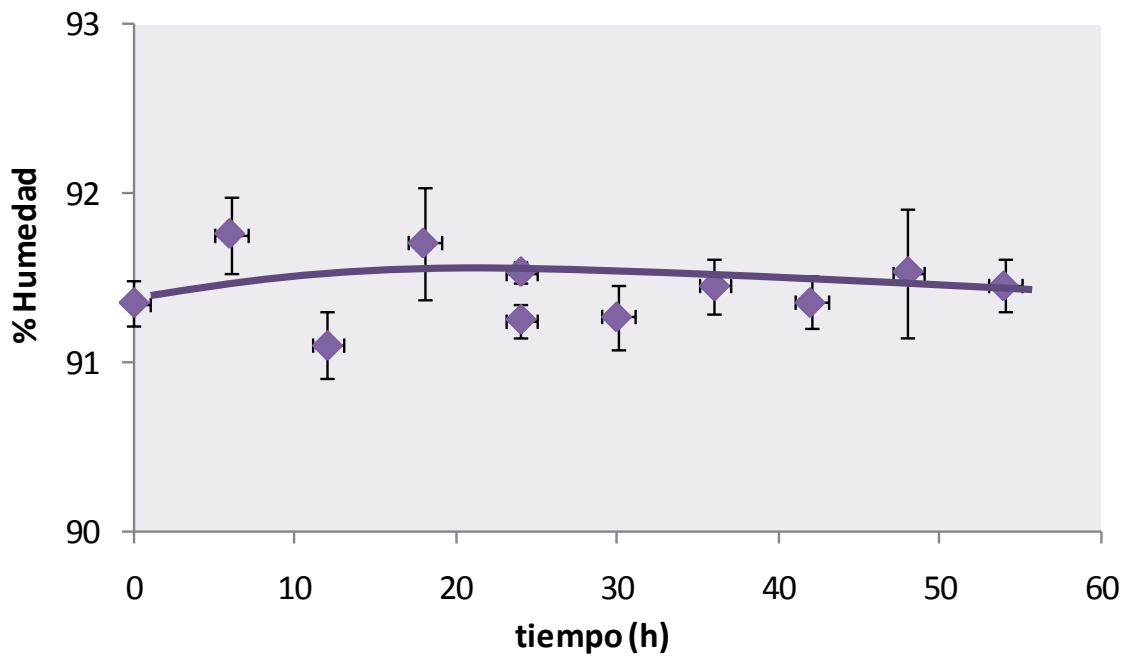


Figura 17. Gráfico de la variación de la humedad con respecto al tiempo en la etapa de fermentación para la elaboración de Tescüino de maíz azul.

En general, durante la etapa de germinación, la humedad aumenta 2.26 veces con respecto a la inicial, para la etapa de cocción era 5.65 veces mayor que la del grano seco y al final del proceso, el contenido de agua fue 5.8 veces mayor que al inicio. En la Figura 18, se muestran los porcentajes máximos de humedad para cada etapa.

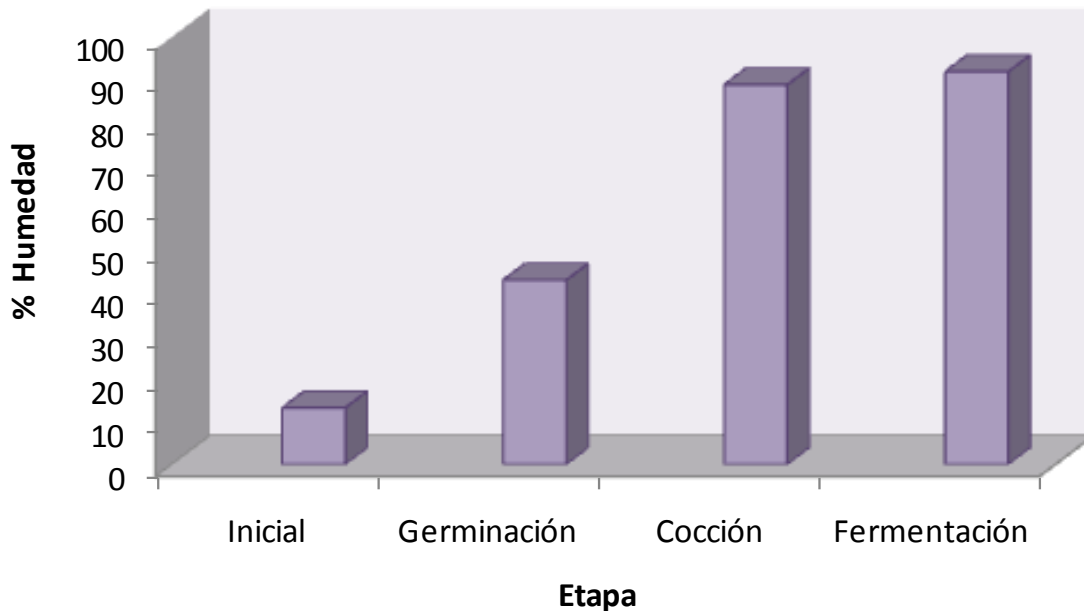


Figura 18. Contenido de humedad máximo durante las cuatro etapas principales del proceso de elaboración de tesgüino.

9.5. Cambios estructurales del grano de maíz con respecto al tiempo de germinación.

Se obtuvieron imágenes a diferentes tiempos de germinación, desde la primera etapa de remojo, hasta la emergencia de la radícula en tres semillas diferentes, usando como criterio para su selección el diámetro de Feret (en la Tabla 16 se muestra el análisis estadístico correspondiente) en las Figuras 19 y 20 se muestran como ejemplo las imágenes de uno de los granos.

Las imágenes correspondientes a los frentes de las semillas fueron utilizadas para aislar la parte correspondiente al germen. Se observa un evidente aumento de volumen en la imagen de 24h, mientras que la emergencia de la radícula se comienza a hacer patente entre las 70 y las 72 horas, al final del experimento el crecimiento es evidente (Figura 19).

A partir de las imágenes obtenidas y siguiendo la metodología antes mencionada (ver Métodos, punto 8.13) se obtuvieron los datos correspondientes a los valores del área, diámetro de Feret (dF) y dimensión fractal (Df), los gráficos correspondientes se muestran en las Figuras 21 a 38. Las Figuras 21,

22, 27, 28, 33 y 34 muestran el cambio en la magnitud del área con respecto al tiempo, mientras que las Figuras 21, 27 y 33 muestran los valores individuales, las Figuras 22, 28 y 34 muestran los promedios, a pesar de que son diferentes para cada semilla de forma individual, el comportamiento que observan es el mismo, al igual que el contenido de agua, aumenta rápidamente durante las primeras horas para posteriormente mantenerse relativamente constante. Las variaciones en magnitud del diámetro de Feret se observan en las Figuras 23, 24, 29, 30, 35 y 36, al igual que en el caso de la magnitud del área, las Figuras 23, 29 y 35 muestran los valores individuales y las Figuras 24, 30 y 36 los valores promedio, en el caso del grano entero en ambas vistas (frente y costado, figuras 23, 24, 35 y 36 respectivamente), se observa más uniformidad que en el caso de las áreas, cuando menos en el tiempo cero, esto es debido a que fue este parámetro el que se tomó como criterio de selección, no así para el dF del germen cuyo valor es independiente del grano entero, sin embargo, también se registra en general un aumento con respecto al tiempo de germinación (Figuras 29 y 30).

Tabla 16. Parámetros estadísticos en base al diámetro de Feret usados para la selección de las semillas empleadas en el análisis de imagen.

Media	1.957
Error típico	0.0128
Mediana	2
Moda	2
Desviación estándar	0.1281
Varianza de la muestra	0.0164
Coefficiente de asimetría	-0.5264
Rango	0.4
Mínimo	1.7
Máximo	2.1
Suma	195.7
Cuenta	100
Nivel de confianza (95.0%)	0.0254

Al comparar los gráficos de humedad, área y diámetro de Feret con respecto al tiempo de germinación (Figuras 25, 31 y 37), se observa que todos los parámetros aumentan rápidamente durante las primeras 8 horas para posteriormente aumentar a menor velocidad hasta mantenerse prácticamente constantes aproximadamente a las 24 horas en el caso del frente y del germen. En el caso del costado, se observan aumentos aún al final del experimento, esto es porque la radícula emerge en esta

dirección. En el caso de la dimensión fractal, se observan 3 picos recurrentes en las tres tomas, el primero aproximadamente entre las 4 y 7 horas, siendo más rápido en el caso del costado del grano, el segundo pico se da a las 48h en el caso del frente y el germen y a las 50h en el caso del costado mientras que el tercer pico se ubica a las 76h en el caso del frente y el germen y a las 72h en el costado. Tomando en cuenta que la dF es una medida de la irregularidad de la semilla, el primer pico podría ser atribuido a que el hinchamiento del grano provoca que la irregularidad vaya disminuyendo por la acumulación de agua en el interior, el tercer pico corresponde al tiempo que como se mencionó anteriormente, la radícula es evidente, es decir, el grano ha germinado. El segundo pico en cuestión, se cree que pudiera deberse al crecimiento interno de la radícula (antes de ser visible).

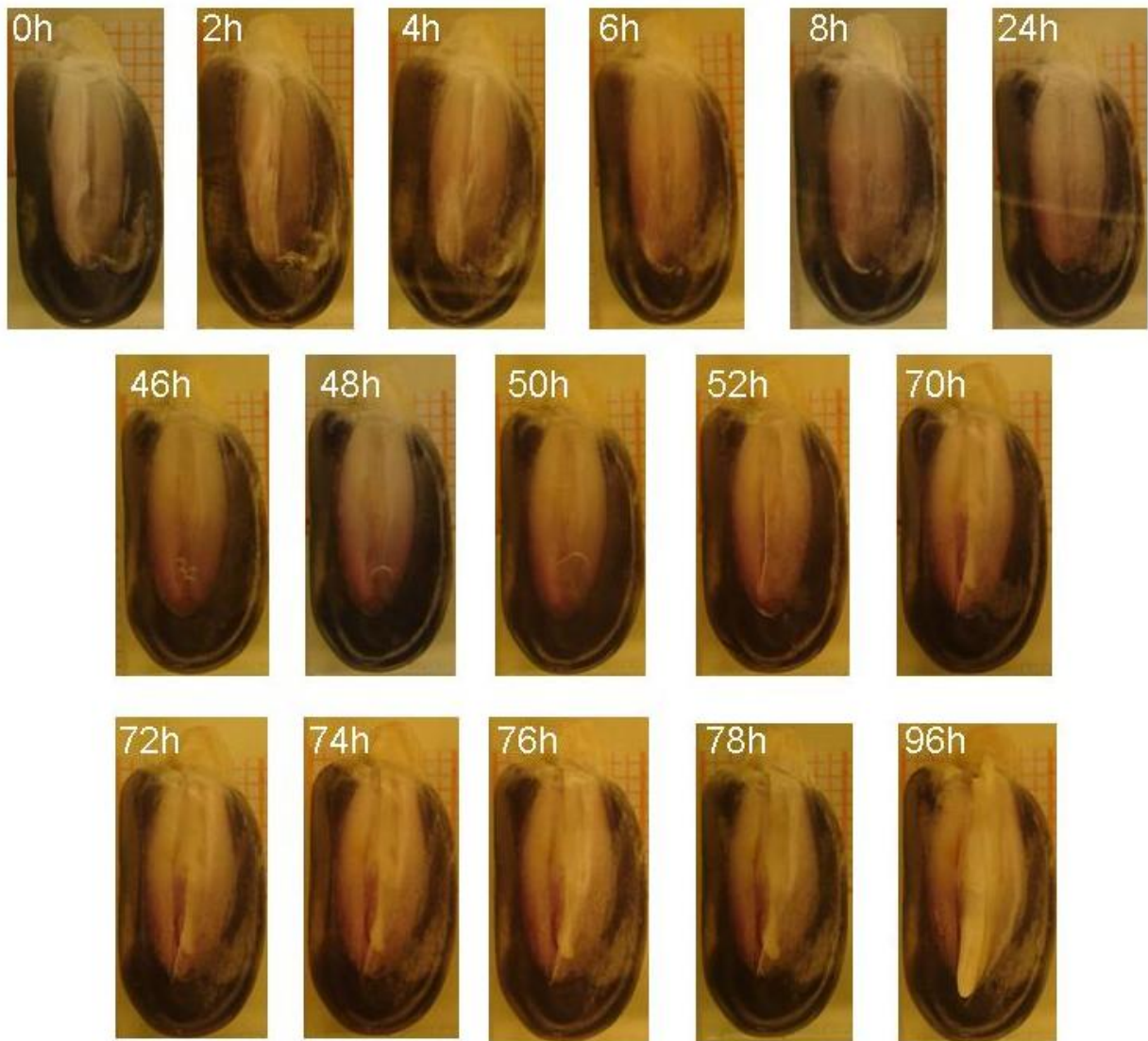


Figura 19. Imágenes obtenidas de maíz (frente) a diferentes tiempos de germinación

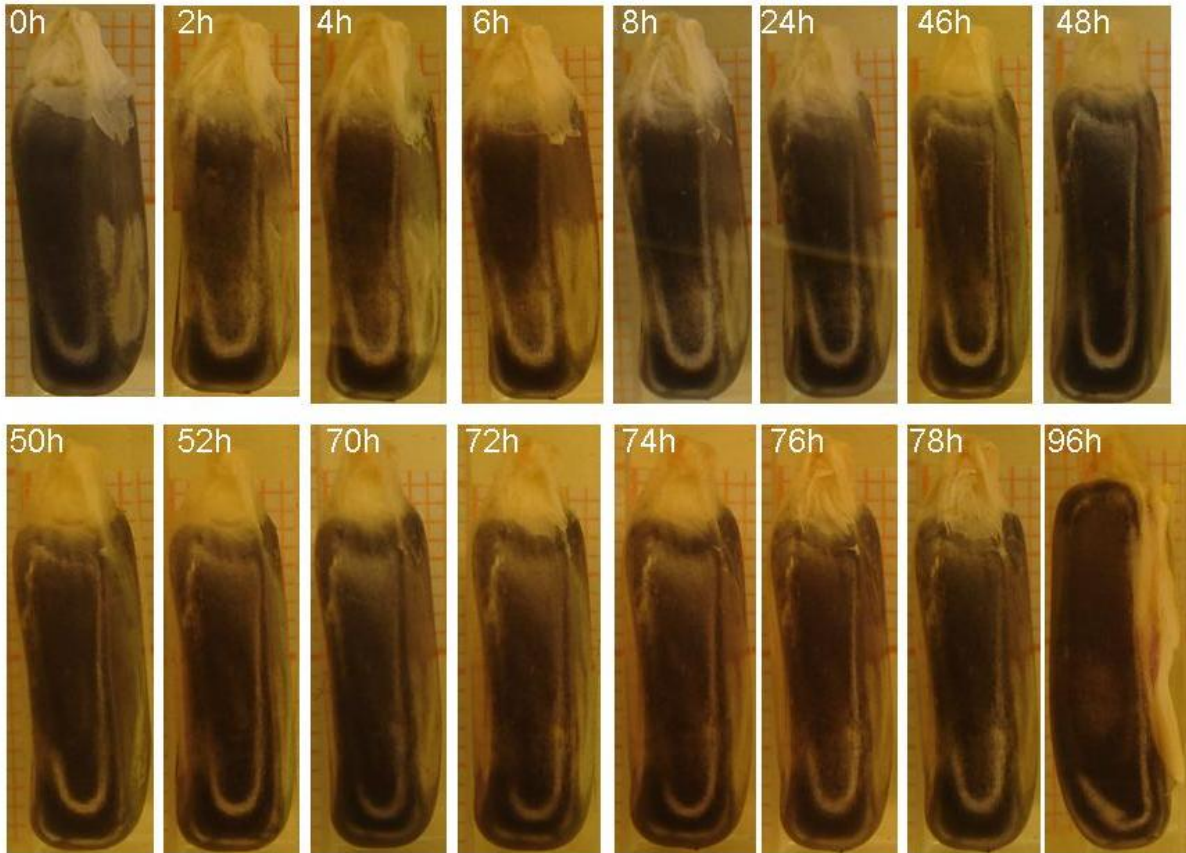


Figura 20. Imágenes obtenidas de maíz (costado) a diferentes tiempos de germinación.

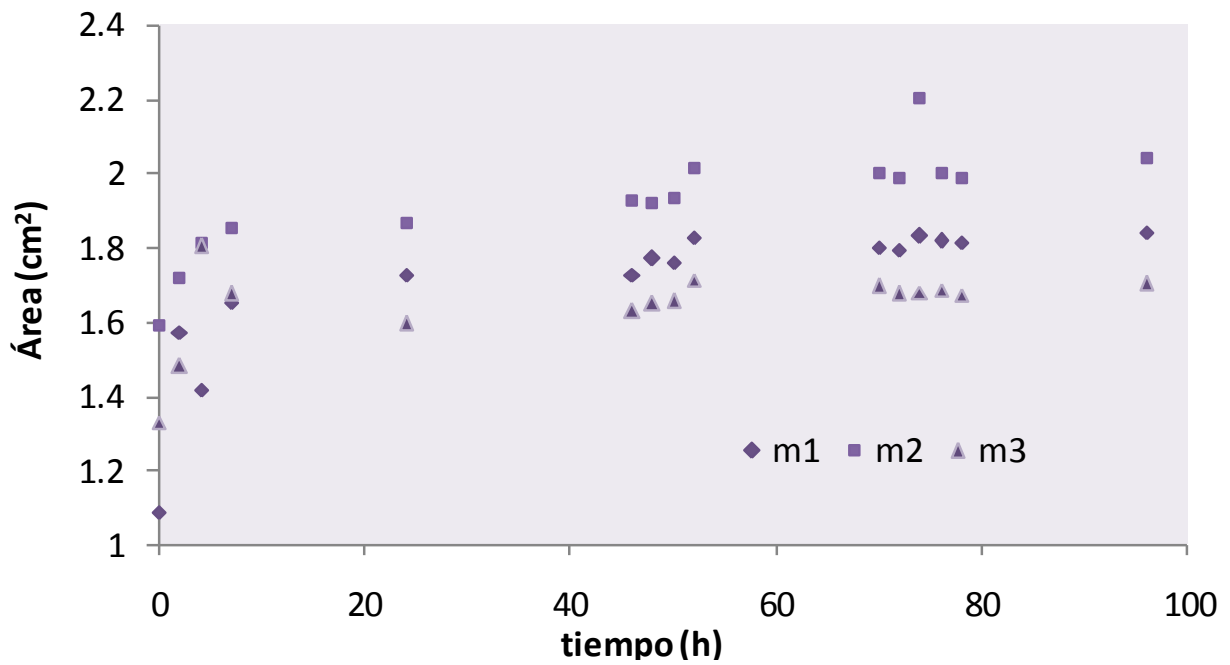


Figura 21. Gráfico de la variación de la magnitud del área del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

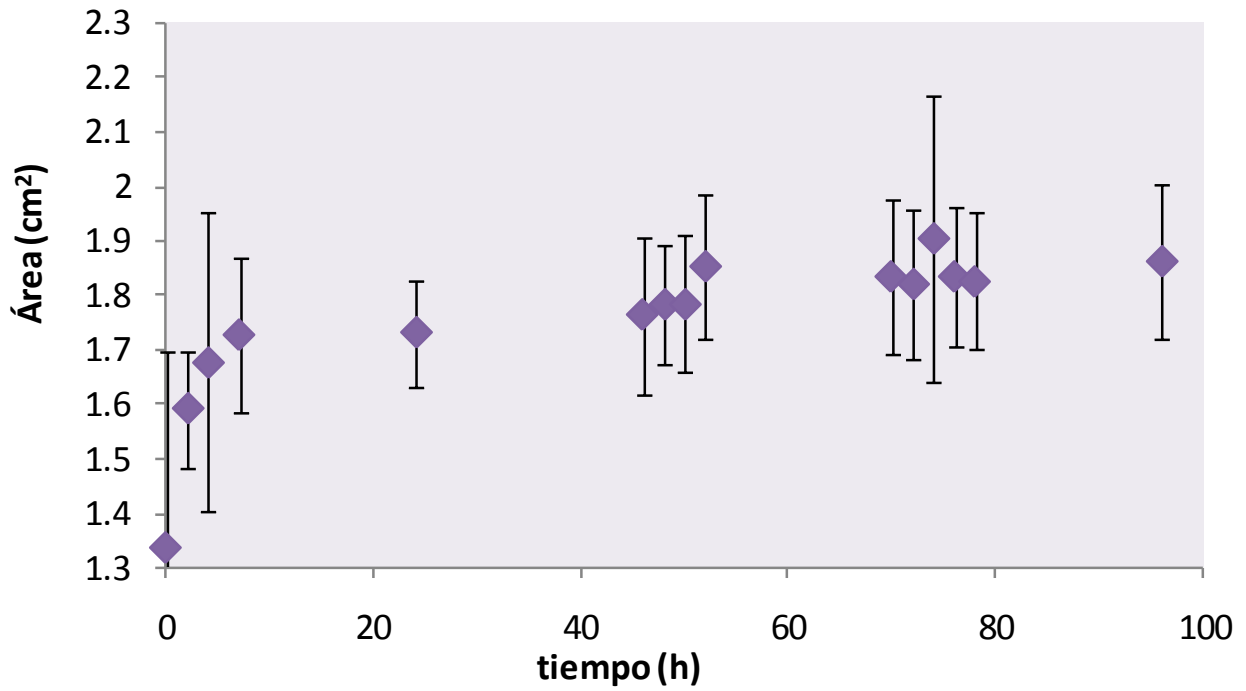


Figura 22. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

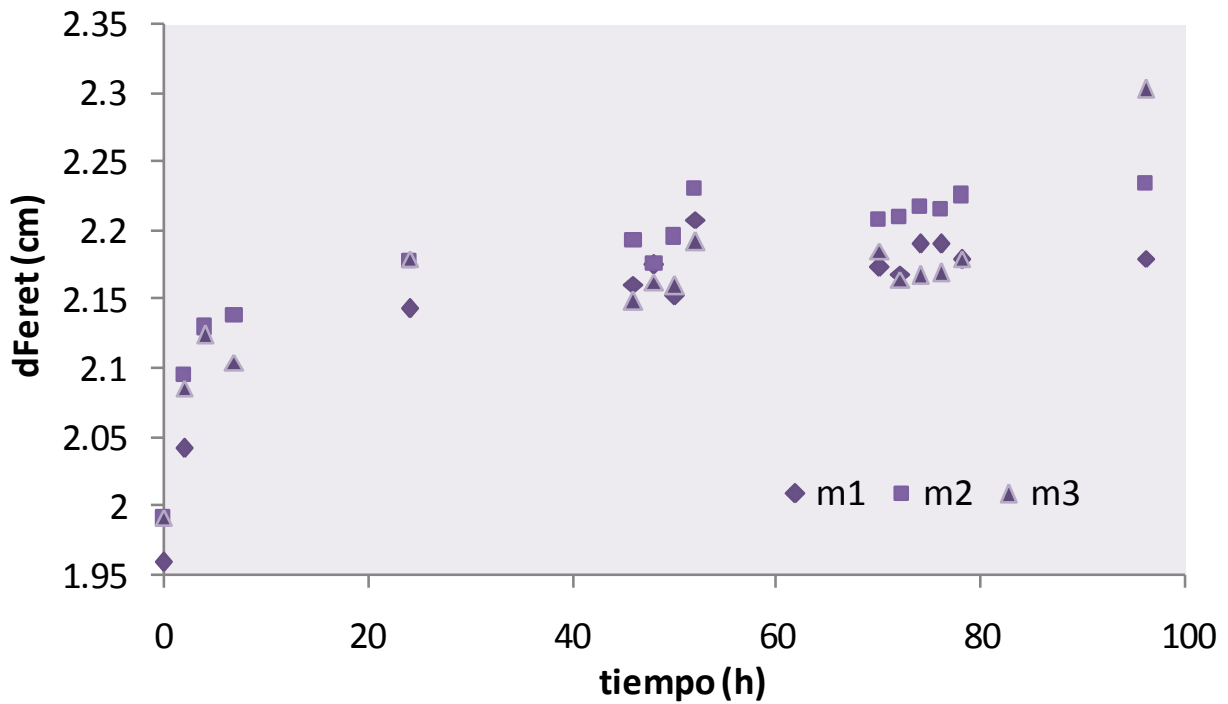


Figura 23. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

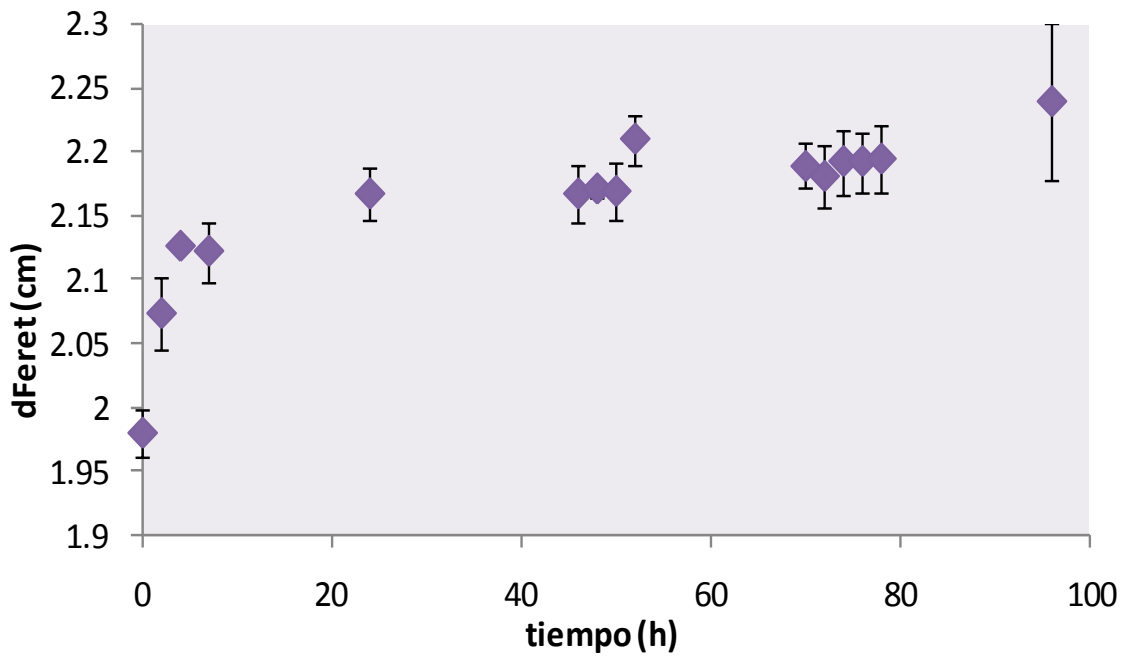


Figura 24. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

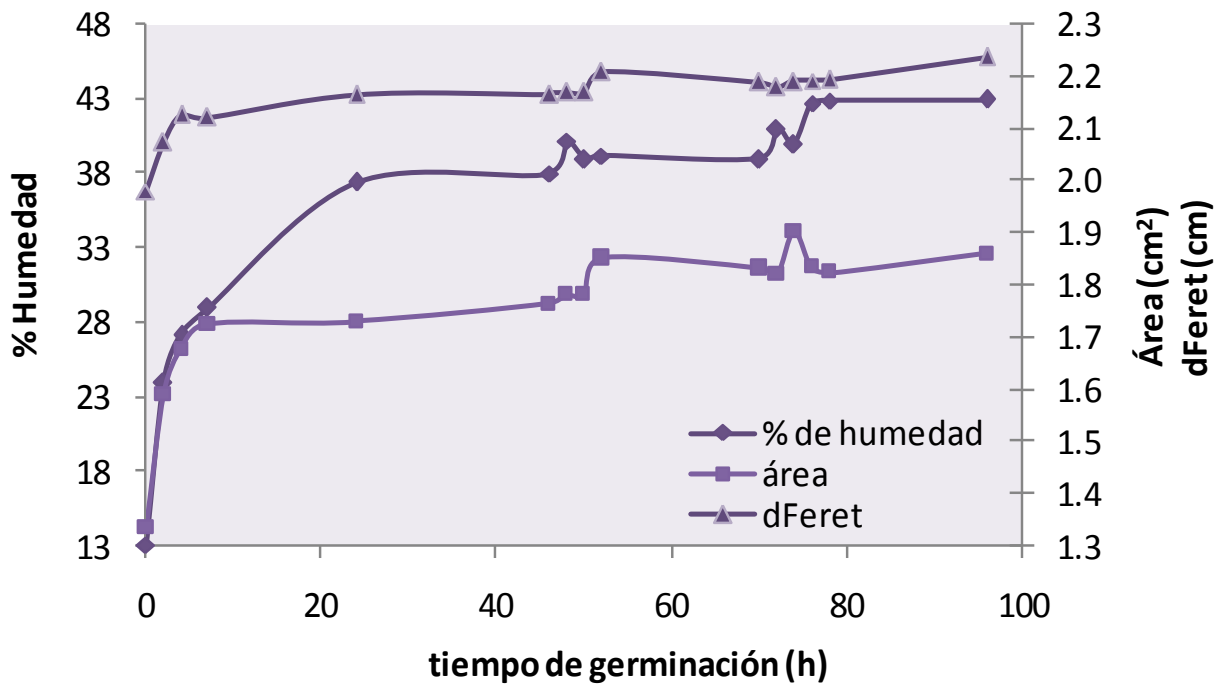


Figura 25. Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

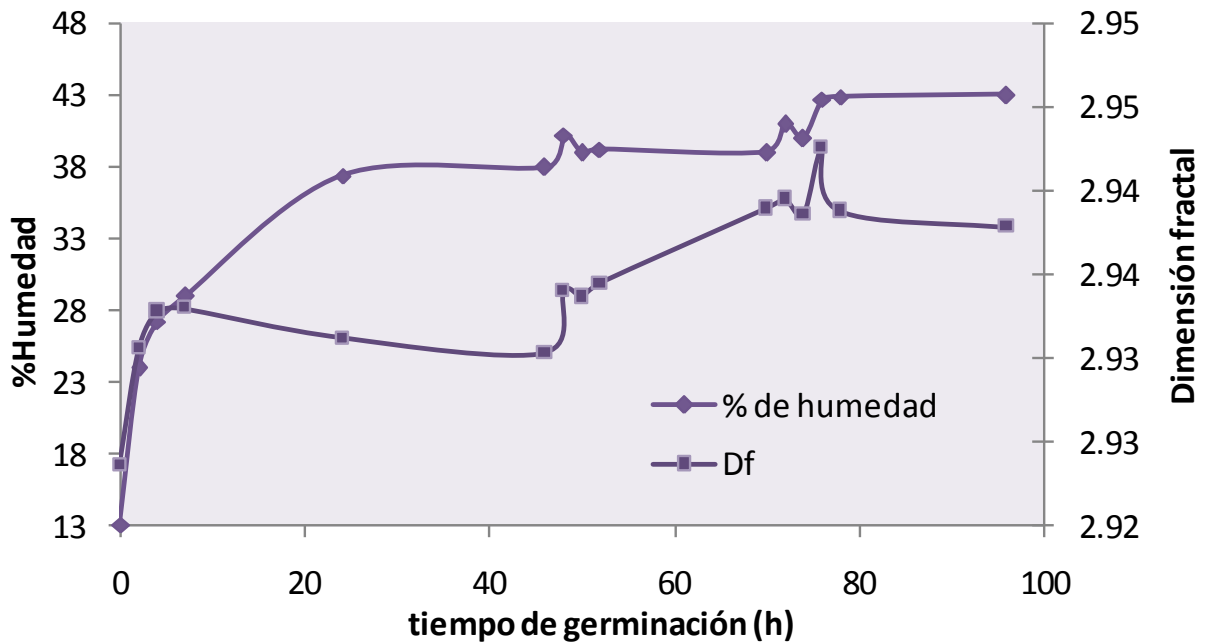


Figura 26. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del frente del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

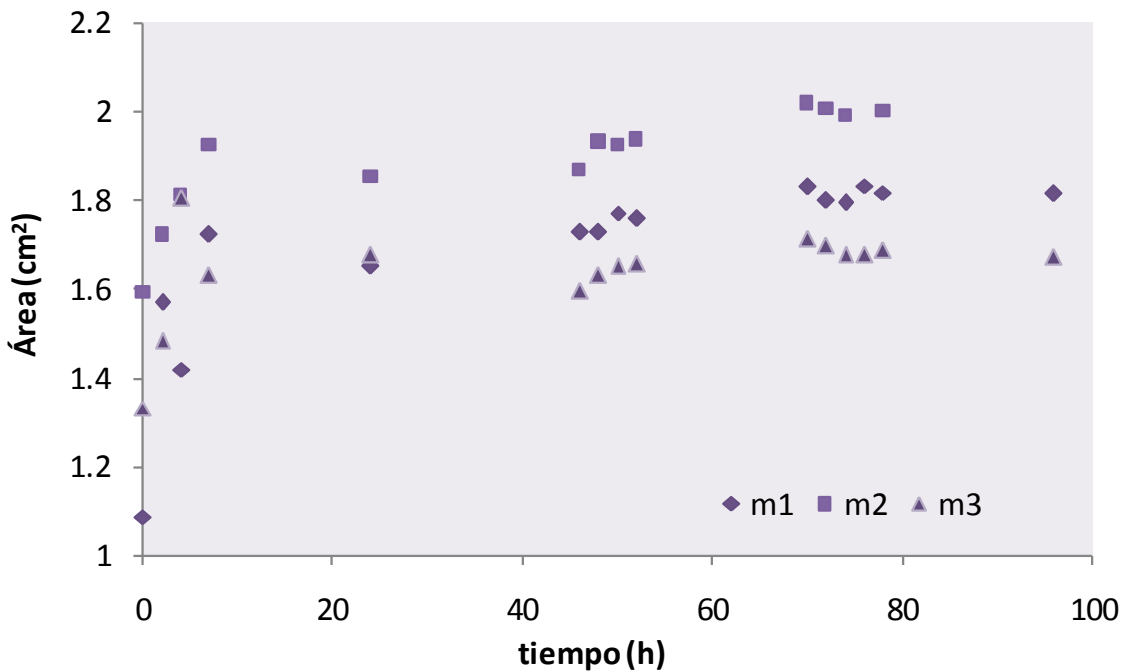


Figura 27. Gráfico de la variación de la magnitud del área del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

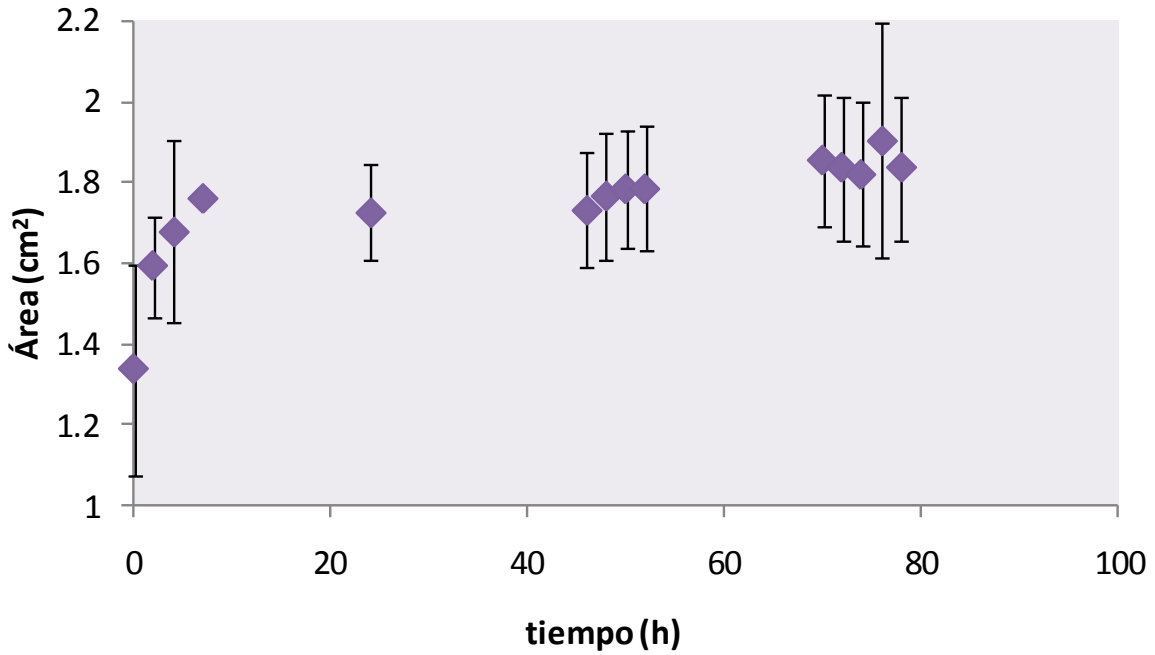


Figura 28. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

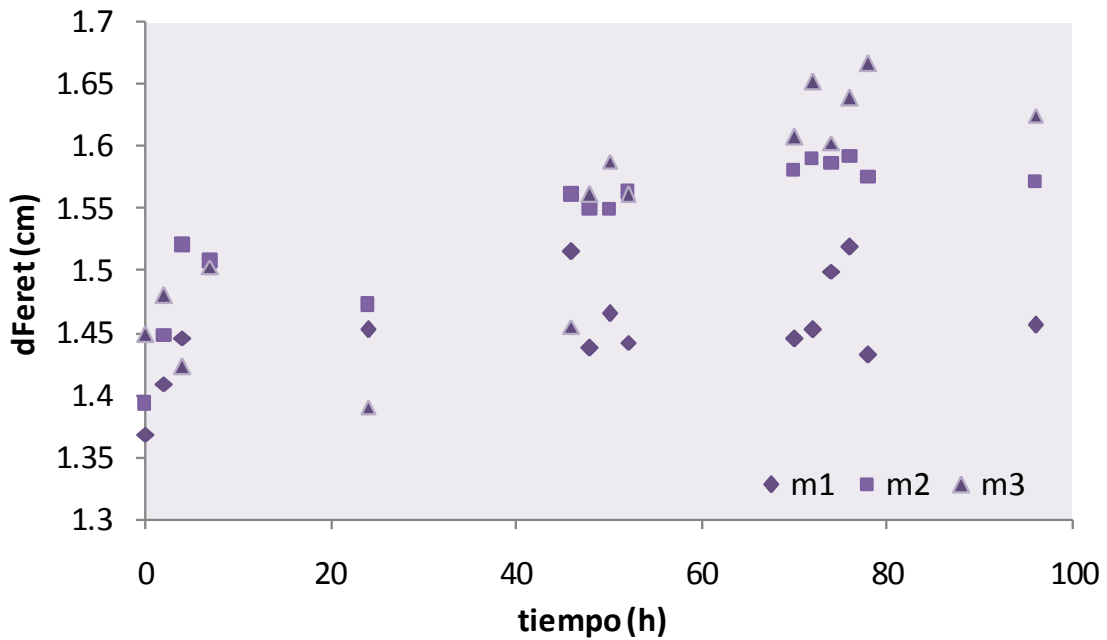


Figura 29. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

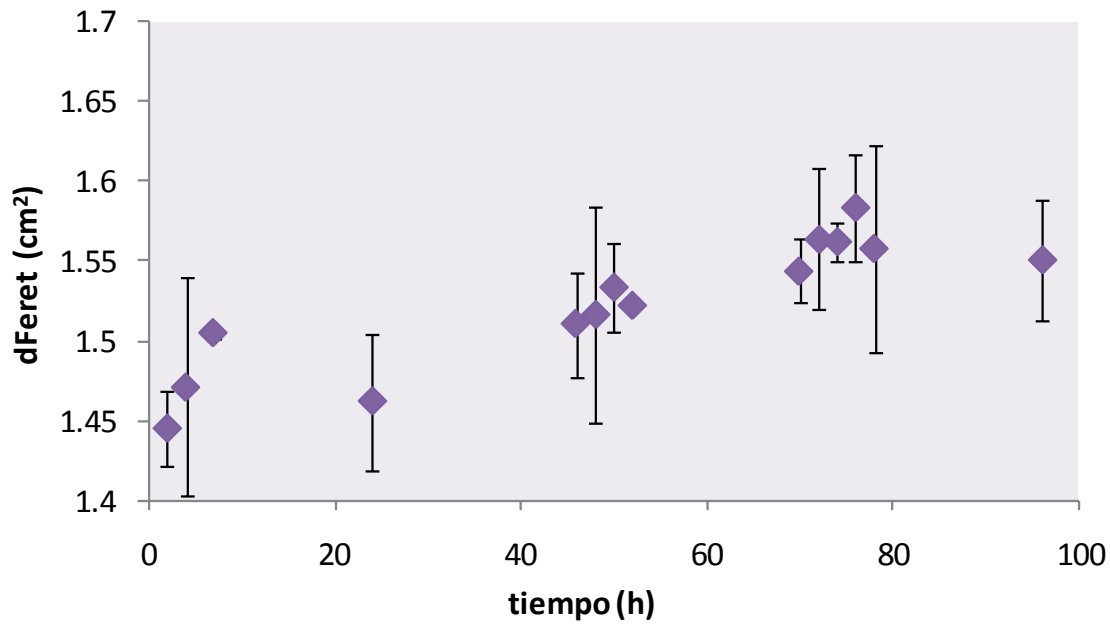


Figura 30. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret promedio del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

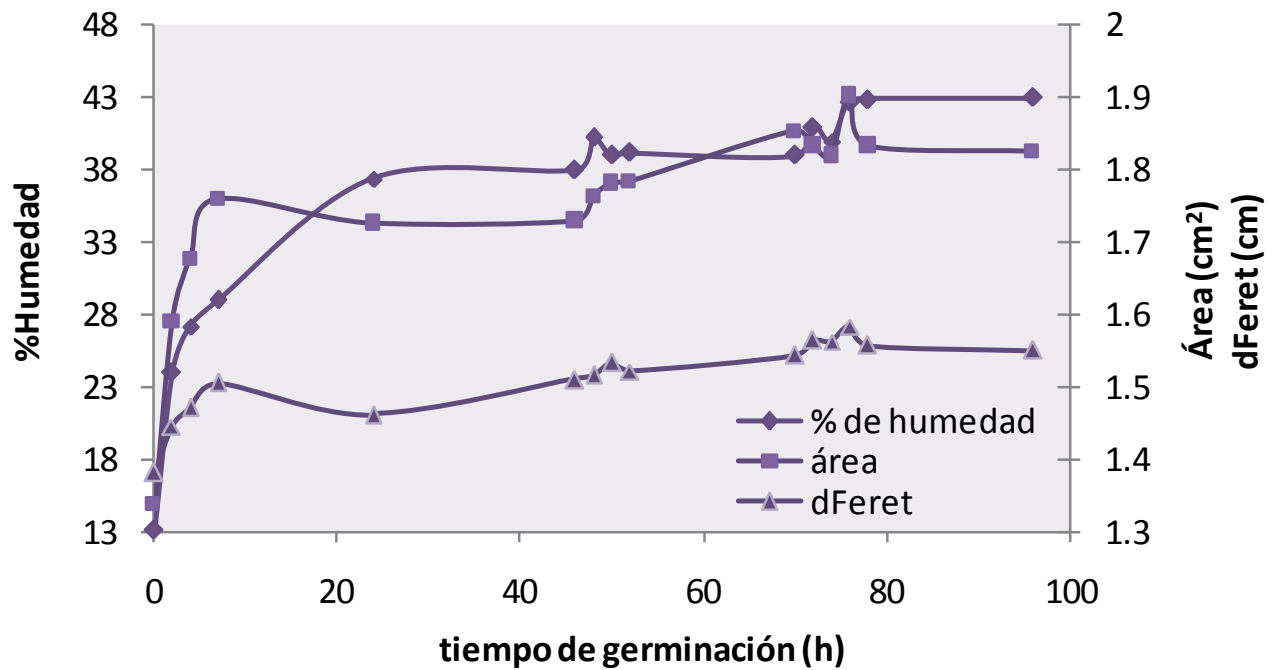


Figura 31. Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

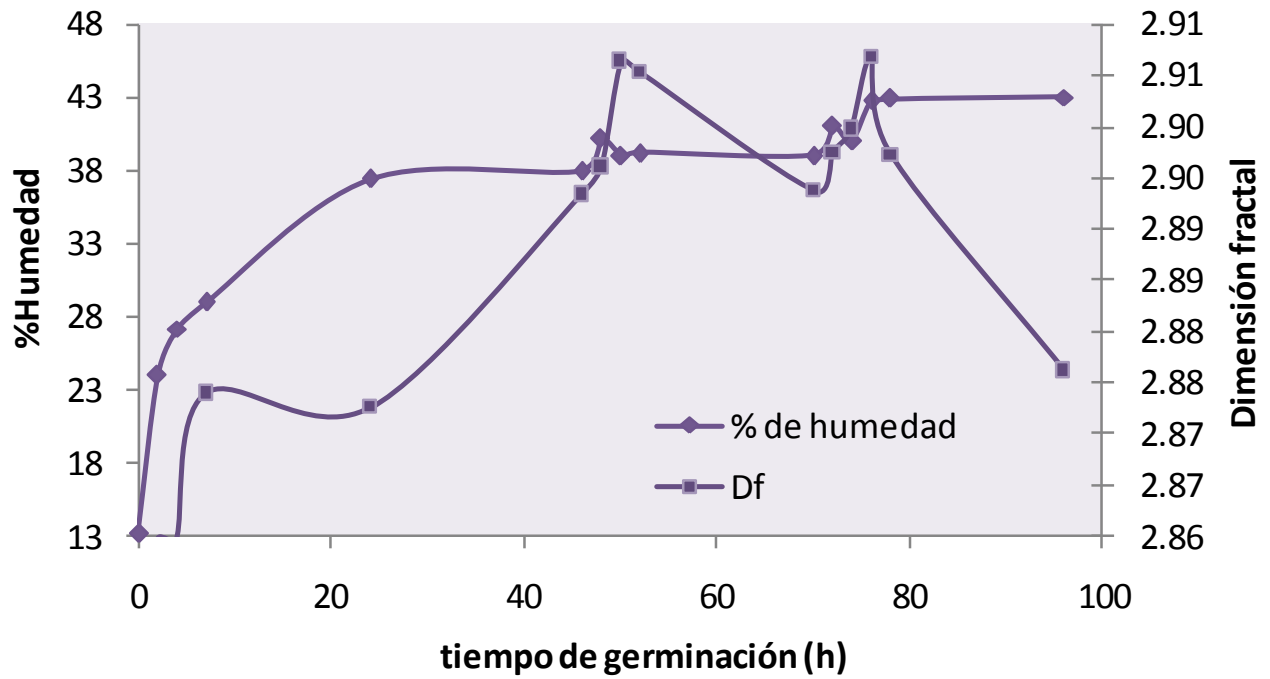


Figura 32. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del germen del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

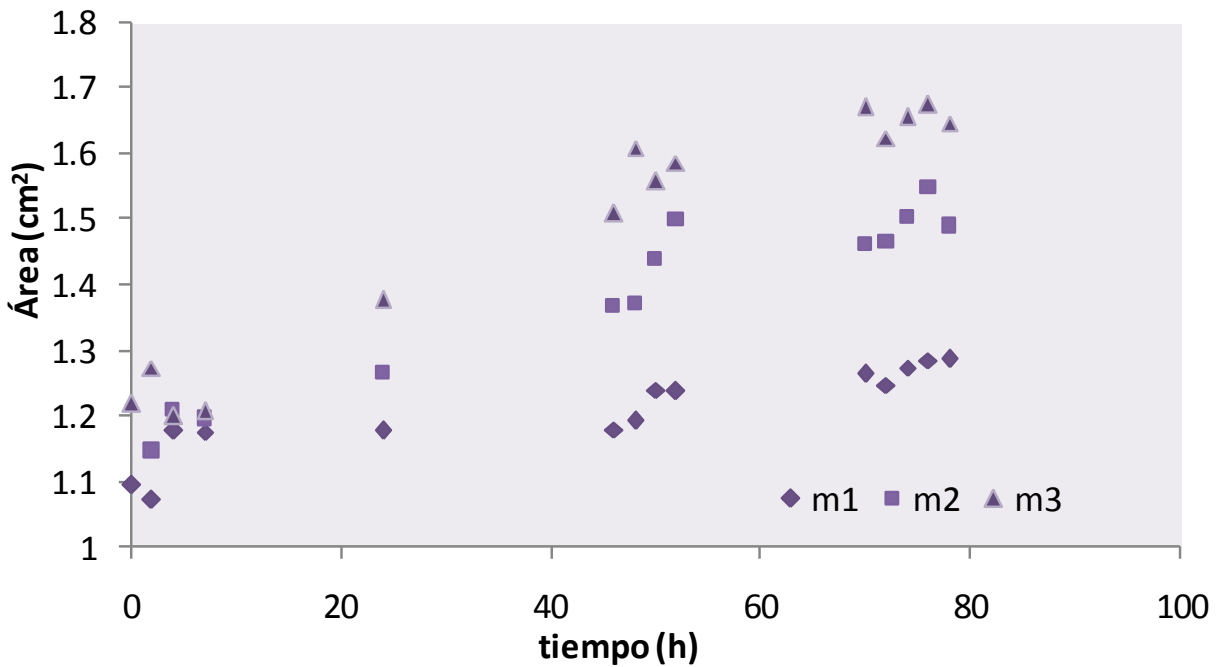


Figura 33 . Gráfico de la variación de la magnitud del área del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

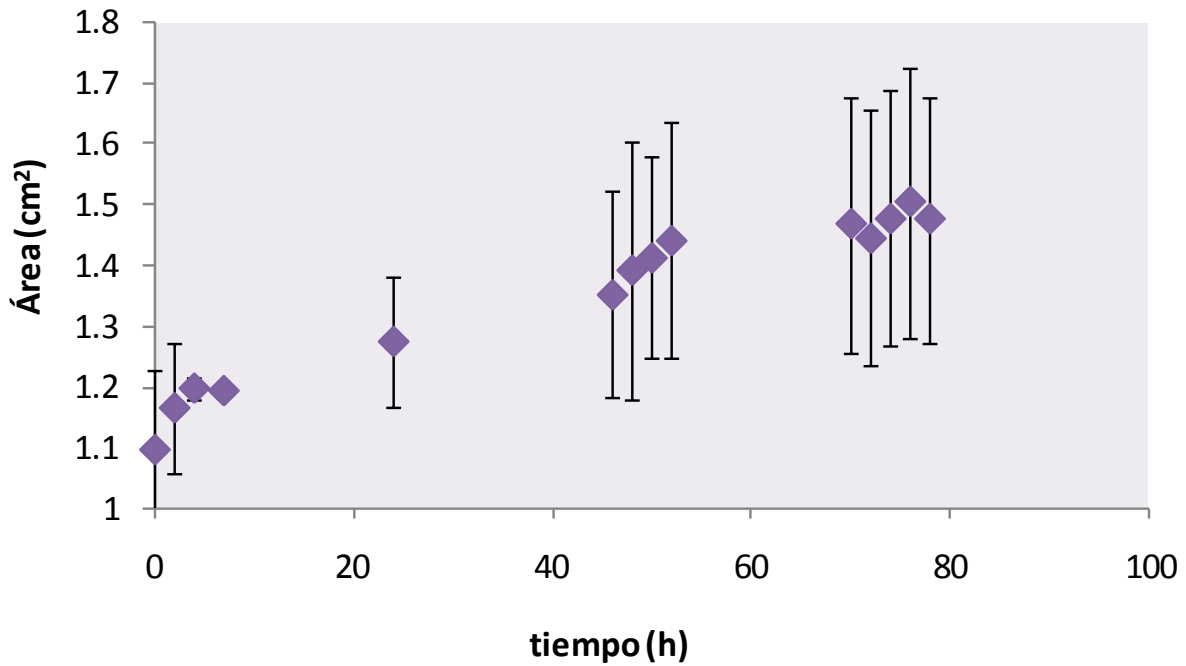


Figura 34. Gráfico de la variación de la magnitud promedio del área del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

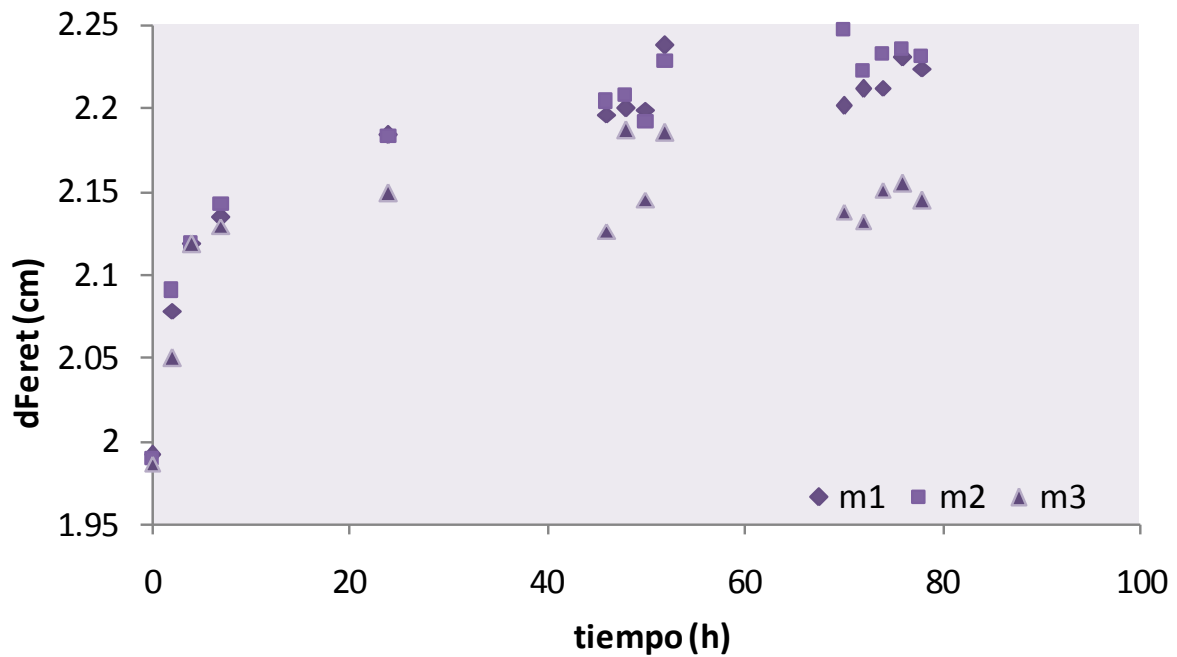


Figura 35 . Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

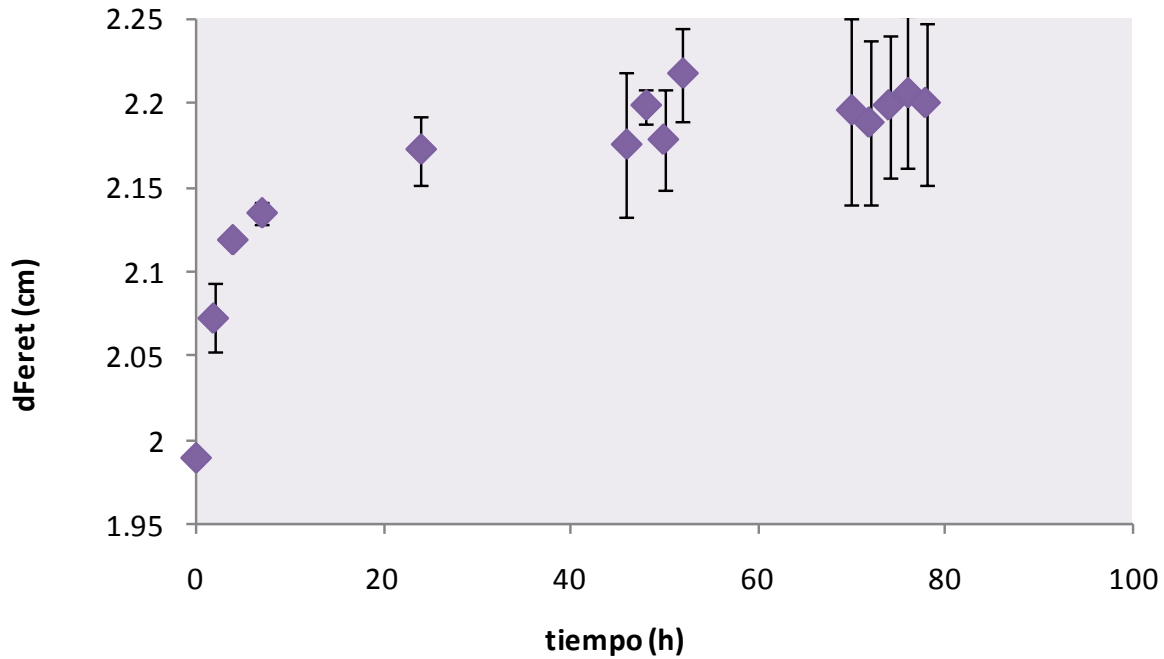


Figura 36. Gráfico de la variación de la magnitud del diámetro de Feret promedio del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

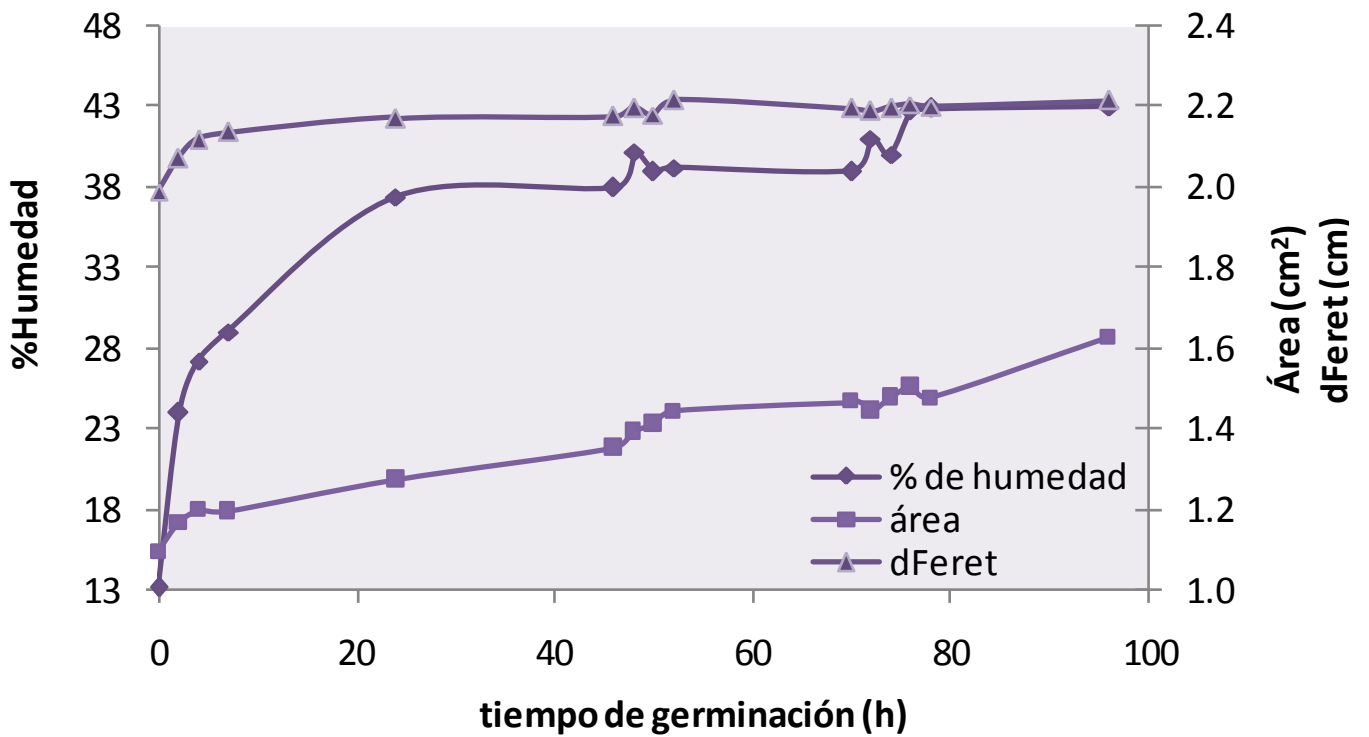


Figura 37 . Gráfico de la variación de humedad, área y diámetro de Feret del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

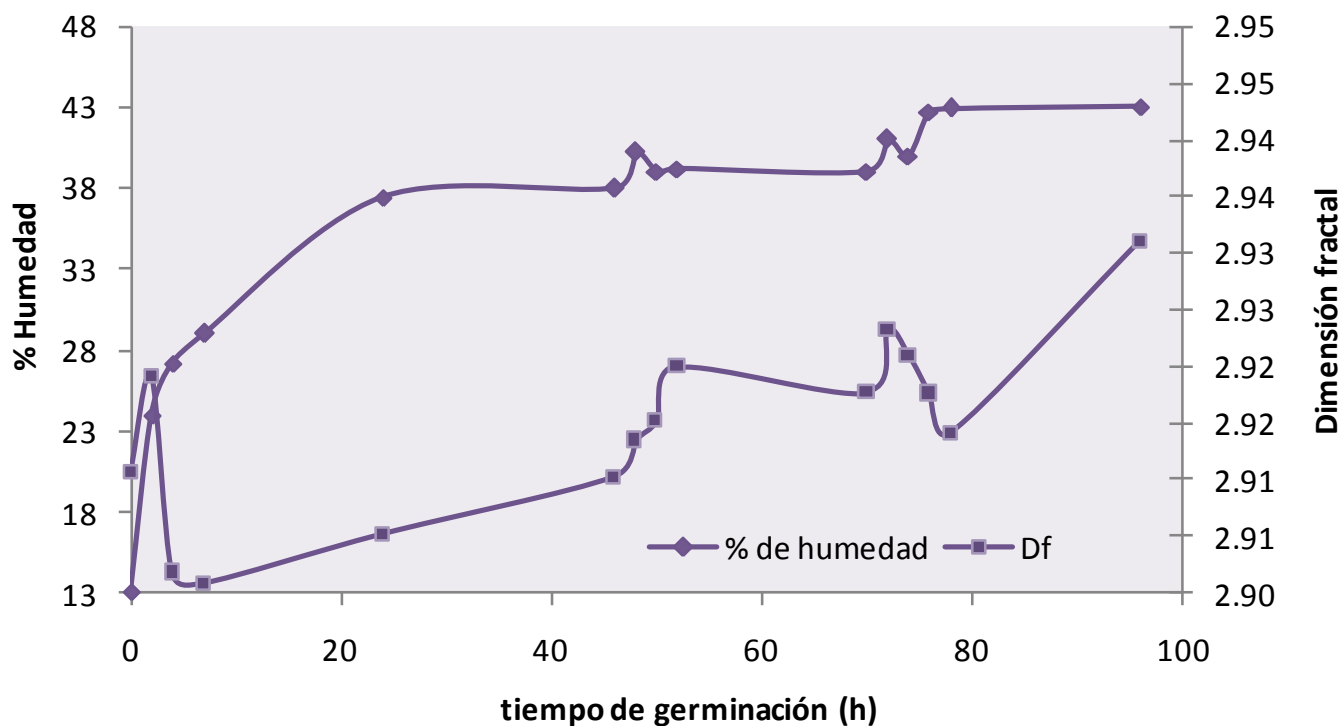


Figura 38. Gráfico de la variación de humedad y la dimensión fractal del costado del grano de maíz azul con respecto al tiempo de germinación.

En trabajos realizados por A Dell'Aquila (2005), se utilizó un sistema de adquisición y análisis de imagen para investigar el uso de este para evaluar la duración de las fases de imbibición y elongación de la radícula de semillas de brócoli y rábano, en dicho estudio, se adquirieron imágenes bidimensionales de dichas semillas y se observaron sus cambios en tamaño y forma durante las tres fases de la germinación. Al igual que en este estudio, encontraron un aumento rápido en la magnitud del área de la semilla durante las primeras horas del proceso, al término de esta fase I, un punto de inflexión (Figura 25) correspondiente al inicio de la fase 2 en que el área de la semilla aumenta a baja velocidad y un segundo punto de inflexión correspondiente al inicio de la fase 3 de elongación de la radícula, con un aumento rápido en la magnitud del área nuevamente, ésta última etapa no se muestra en este estudio debido a que solo se registraron imágenes hasta antes de la aparición visual de la radícula. De acuerdo con el autor antes mencionado, el análisis de imagen es una herramienta objetiva y precisa de describir los fenómenos estructurales ocurridos durante la germinación de las semillas comparado con los métodos tradicionales basados en la inspección visual y las medidas manuales, los resultados de

este análisis, pueden ser utilizados para estimar la duración de los tratamientos osmóticos, salinos o de altas temperaturas a que son sometidas las semillas para evaluar su vigor y tolerancia al estrés.

En un estudio posterior (2007) publicado por el mismo autor (A Dell'Aquila), se menciona a la magnitud de área (euclidiana) como el parámetro más sensible para monitorear las fases de absorción de agua durante la germinación, además se sugiere que el análisis de imagen de las semillas durante su germinación, representa una técnica innovadora para determinar la calidad de las semillas, clasificarlas e identificarlas (usando técnicas más complejas como el análisis de imágenes tomadas por medio de Rayos-X), siendo este tipo de técnicas rápidas, económicas, no destructivas y precisas.

No existen referencias con respecto al uso en este contexto de la geometría fractal, sin embargo, los tres picos observados en el valor del área fractal del grano, pudieran relacionarse a las tres fases ya mencionadas lo que tendría que verificarse con estudios posteriores más detallados que incluyesen pruebas bioquímicas y cortes transversales, de verificarse dicho fenómeno, ya que los picos son más pronunciados que en el caso del área euclidiana, el cálculo de la dimensión fractal podría ser un parámetro más preciso para la determinación de las diferentes fases de absorción de agua durante el proceso de germinación de granos y semillas.

9.6. Cambios en la cantidad de compuestos fenólicos totales durante el proceso de elaboración del tescüino.

El cambio en compuestos fenólicos expresado como mg de ác. gálico o de ác. ferúlico por cada 100g de maíz se calculó interpolando en dos curvas tipo (una para cada ácido, Figuras 39 y 40). Al igual que en el contenido de antocianinas, la de compuestos fenólicos aumenta durante la germinación (189%) (Figura 41), como ya se discutió anteriormente, debido probablemente a la síntesis de nuevos compuestos fenólicos como respuesta al estrés (Deosthale, 2003)

Durante la cocción (Figuras 42 y 43), al igual que con la cantidad de antocianinas, hay un decremento importante, de 42% debido probablemente a la temperatura y el tiempo de cocción así como la exposición a la luz y al oxígeno, pues el proceso se llevó a cabo con agitación constante. Del Pozo y col. (2006) reportan pérdidas del 54 % de compuestos fenólicos totales durante el proceso de nixtamalización de maíz azul mexicano.

En la fermentación (Figura 35), se observa un aumento de 74% con respecto al final de la cocción.

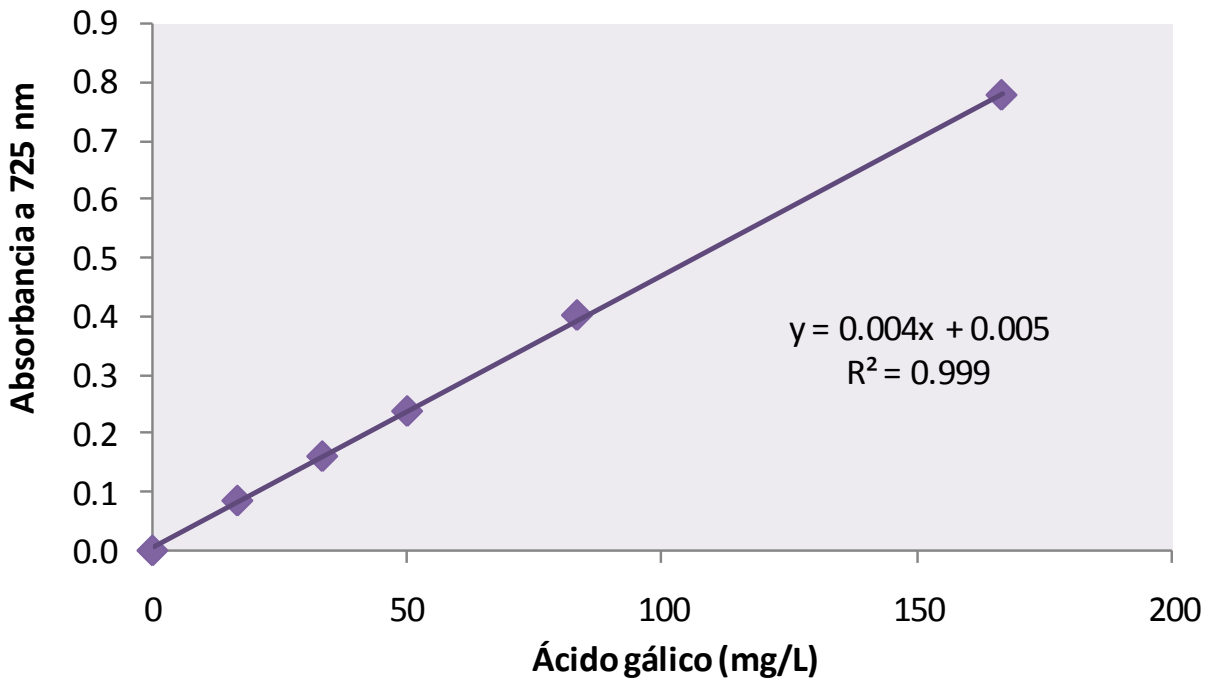


Figura 39. Curva tipo de ácido gálico empleada en la determinación de fenoles totales.

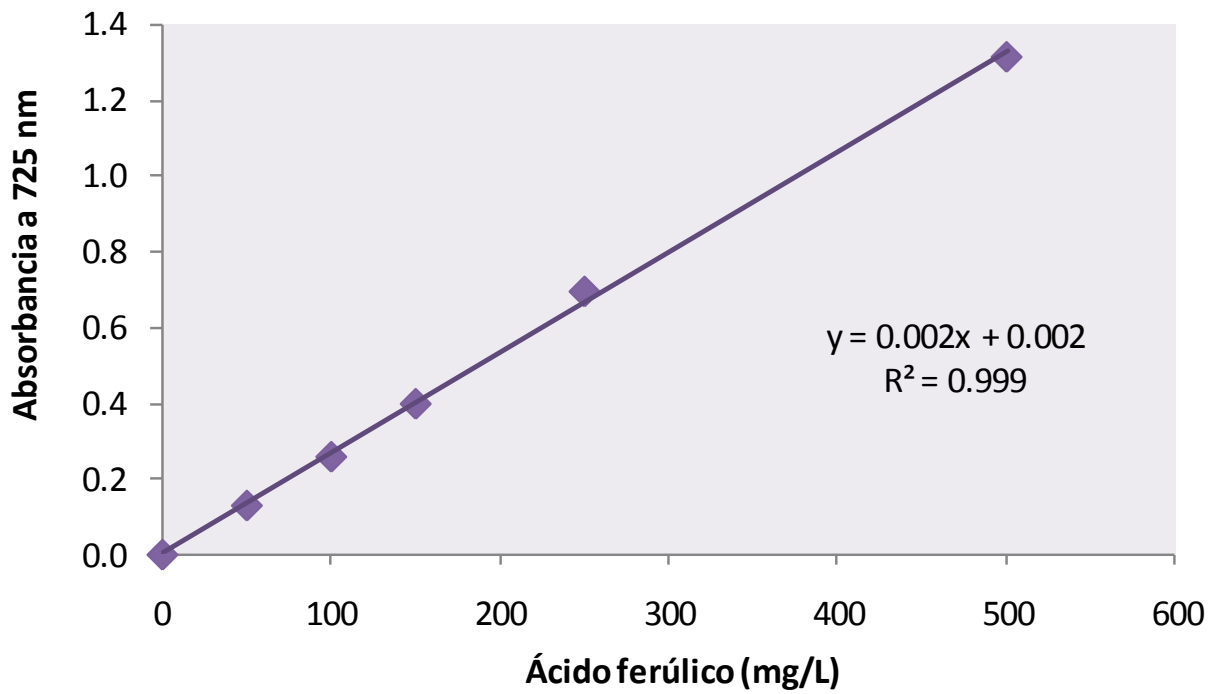


Figura 40. Curva tipo de ácido ferúlico empleada en la determinación de fenoles totales.

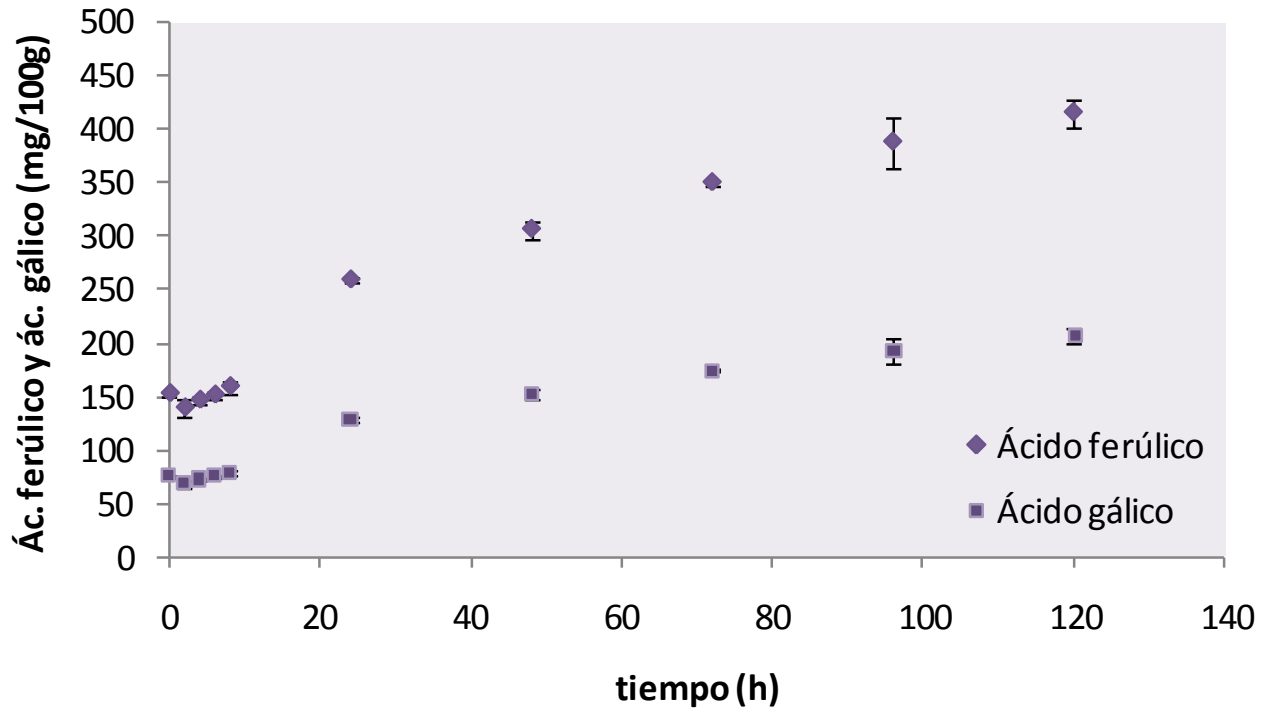


Figura 41. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de germinación de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

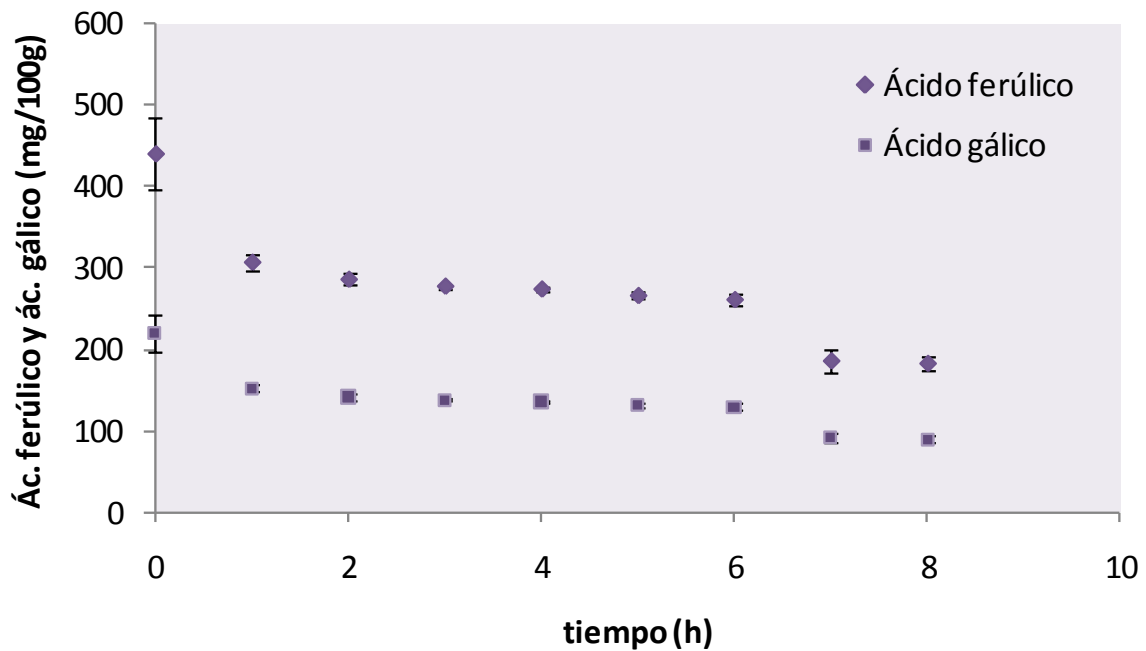


Figura 42. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de cocción del Lote 1 de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

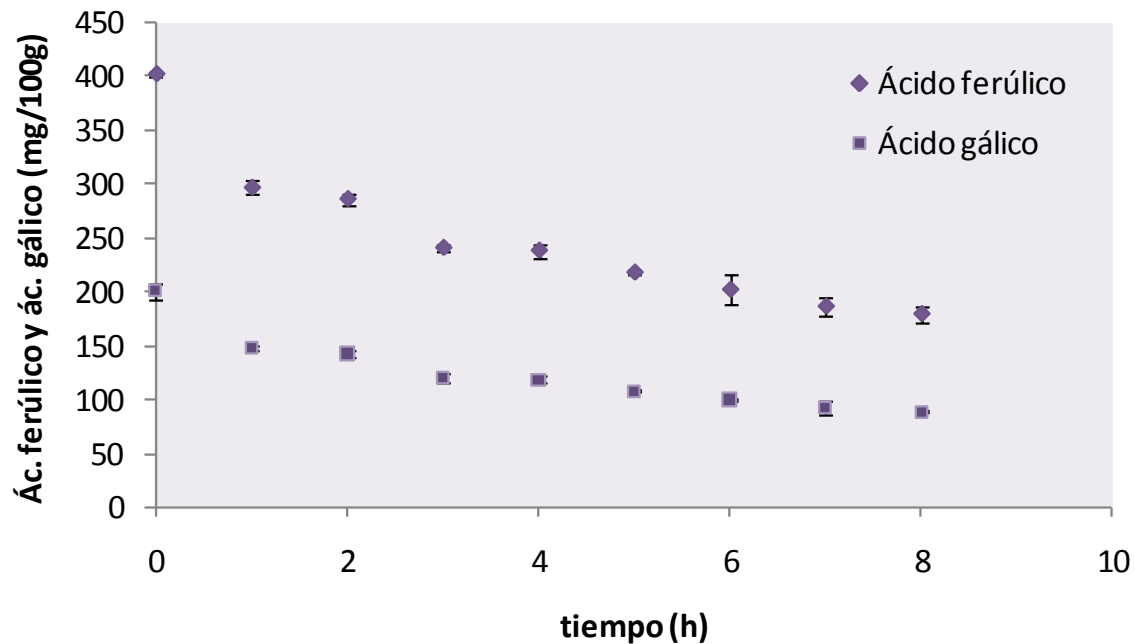


Figura 43. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de cocción del Lote 2 de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

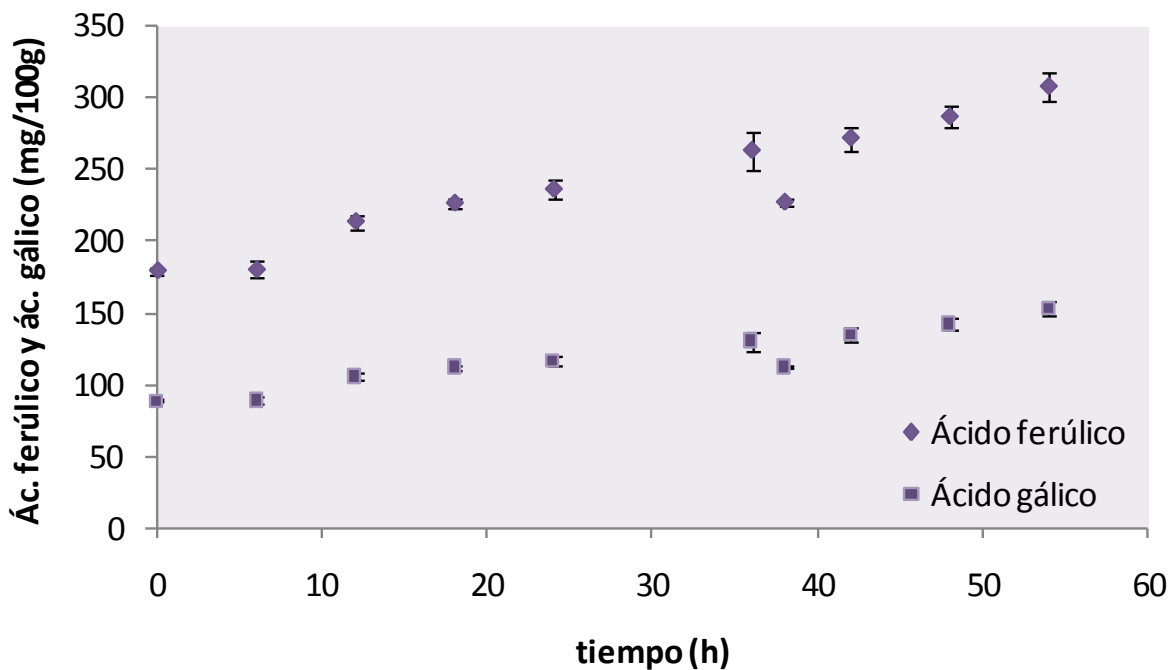


Figura 44. Gráfico de la variación de compuestos fenólicos totales, expresados como ácido gálico y ácido ferúlico con respecto al tiempo de fermentación para la elaboración de tesgüino de maíz azul.

La Figura 36 muestra los resultados obtenidos para la cantidad de compuestos fenólicos totales expresados tanto como mg de ácido gálico como mg de ácido ferúlico, la cantidad final considerablemente mayor con respecto a la inicial, la diferencia es de 101% aproximadamente.

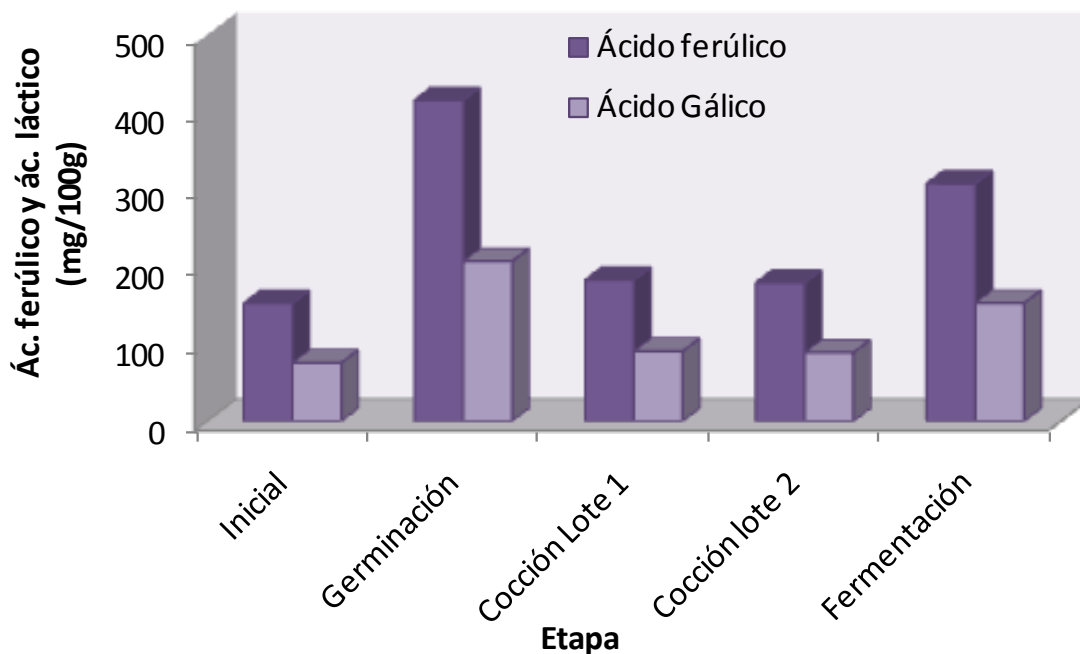


Figura 45. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales en las diferentes etapas de preparación de tescüino de maíz azul.

9.7. Cambios en la cantidad de antocianinas totales durante el proceso de elaboración del tescüino.

La cantidad de antocianinas presentes en el maíz durante su procesamiento fue expresada en términos de cianidina 3-glucósido ya que diversos autores (Escribano, 2004) la reportan como la que se encuentra en mayor proporción en semillas, flores y hojas de la planta de maíz pigmentado, a ésta antocianina le sigue la pelargonidina 3-glucósido.

Como se mencionó con anterioridad, existen múltiples reportes con respecto a los métodos de extracción de antocianinas, todos ellos tratan de extraer cierta cantidad de muestra (fresca, seca o liofilizada) con alguna solución extractora compuesta de uno o varios disolventes, entre los más comunes se encuentran reportados en la literatura el etanol, el metanol y la acetona, de estos, se eligieron los alcoholes que son de más fácil manejo lo cuál fue deseable debido al gran número de

muestras a extraer, de éstos, se realizaron pruebas de extracción en medio acidificado y sin acidificar, en una extracción continua de 24 h y en la extracción en dos etapas de 1 h con cambio de disolvente, los resultados de dichos tratamientos se muestran en la Tabla 17, como puede observarse, los mejores rendimientos se obtuvieron con metanol y etanol acidificados en la extracción en dos etapas, siendo en éste último disolvente el de mayor extracción (Figura 46) y por tanto el utilizado para el resto de las determinaciones.

Tabla 17. Extracción de antocianinas de maíz azul usado en este trabajo con diferentes soluciones extractoras.

	Solvente	Cantidad de Solvente (mL)	Tiempo de Extracción (h)	mg de cianidina 3-glucósido/ 100 g de maíz
1.	Metanol 80%	60	1+1	36.5
2.	Metanol 80%/1% HCl 1 N	60	1+1	53.3
3.	Etanol 95 %	60	1+1	24.9
4.	Etanol 95 % /HCl 1 N	60	1+1	56.7
5.	Metanol 80%	30	24	33.9
6.	Metanol 80%/1% HCl 1 N	30	24	51.6
7.	Etanol 95 %	30	24	8.2
8.	Etanol 95 % /HCl 1 N	30	24	50.4

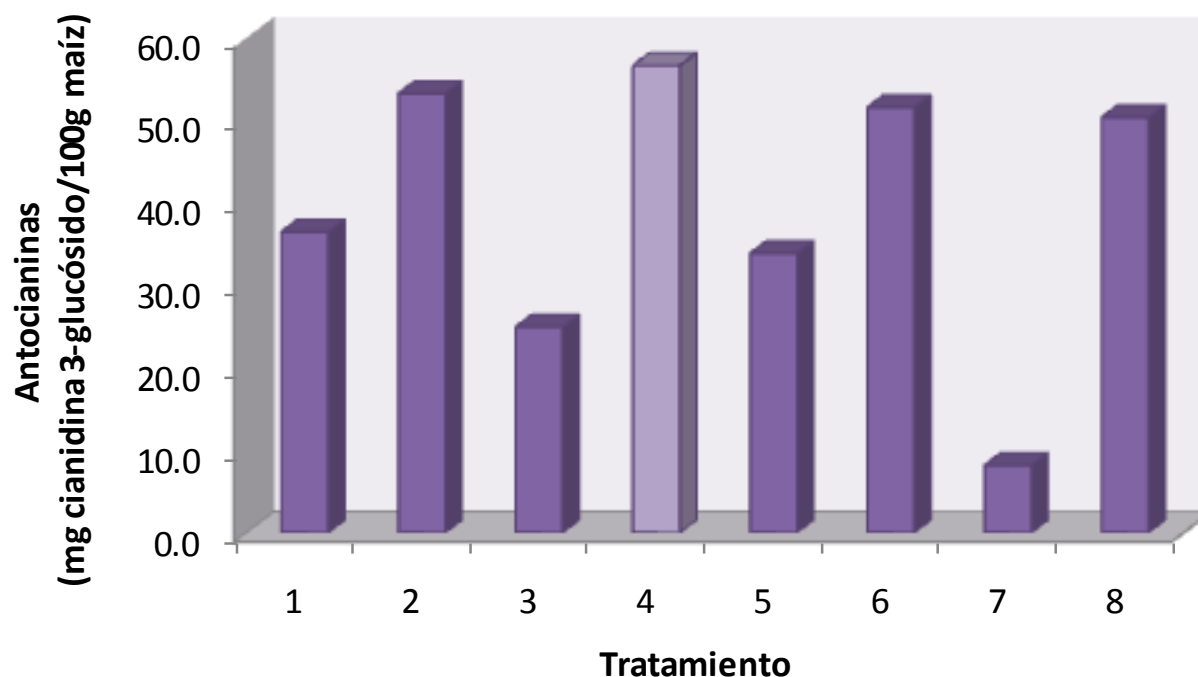


Figura 46. Gráfico de la cantidad de antocianinas extraídas con los diferentes tratamientos especificados en la Tabla 17.

Los cambios en la cantidad de antocianinas se muestran en las Figuras 47, 48, 49 50 y 51. Durante la germinación (Figura 47), se observa que durante el tiempo de imbibición del grano en agua, no hay prácticamente cambios en la cantidad de, sin embargo, al iniciarse la fase 2 de la germinación en que hay profundos cambios bioquímicos (Mohd y col.,1980) la cantidad aumenta (53%). Esto puede deberse por un lado a que durante el proceso, hay ruptura celular (Moreno, 1996) lo cual puede dejar libres dichos compuestos y por otro a que durante la germinación de las semillas, se promueven las respuestas de defensa a través de la biosíntesis de compuestos fenólicos (Randhir y col., 2004).

Durante la cocción del germinado de maíz (Figuras 48 y 49), se observa una disminución importante en antocianinas, aproximadamente 89% de la cantidad registrada al final de la germinación, esto debido probablemente a la exposición de la mezcla al oxígeno (ya que se agitó constantemente durante 8h) y al calor (94 °C por el mismo periodo). En estudios realizados por (Del Pozo y col., 2006) se reportan pérdidas de 37, 54 y 75% en antocianinas durante la nixtamalización, elaboración de tortillas y elaboración de totopos respectivamente, usando como materia prima “maíz azul mexicano”, reportan que la estabilidad de dichos compuestos, está ligada a la presencia de otros compuestos fenólicos dentro de las matrices alimenticias, por tanto, dependerá de cada raza de maíz y de las condiciones de cultivo, cosecha y almacenamiento.

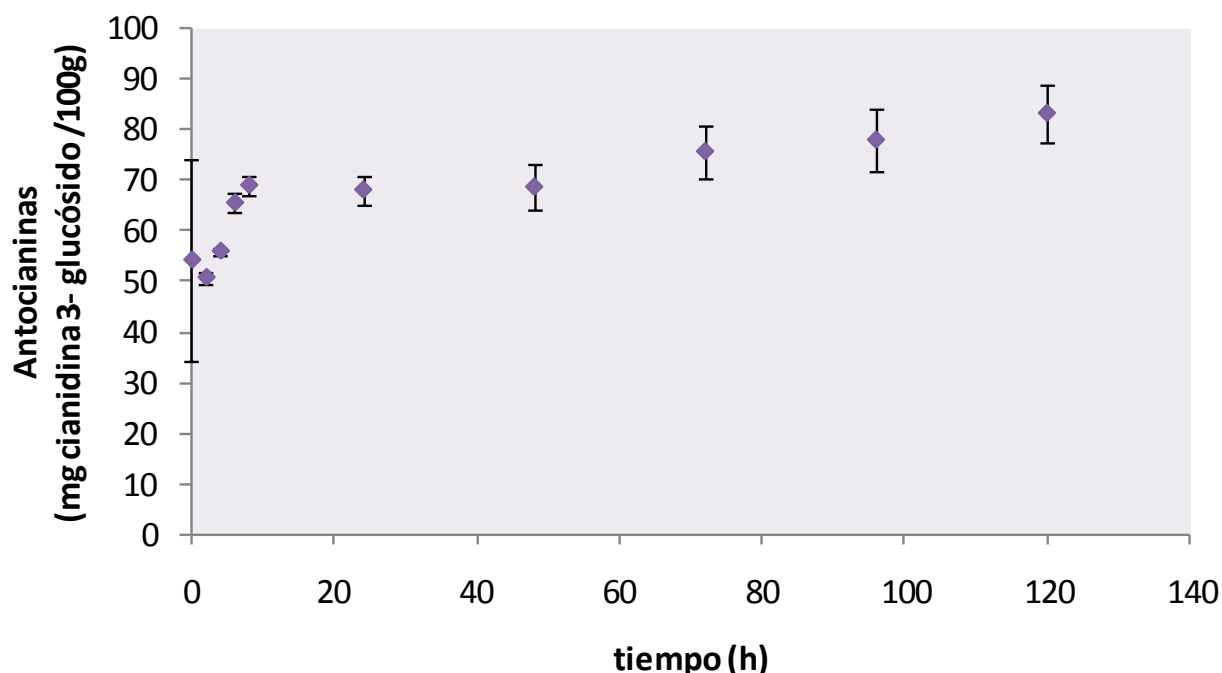


Figura 47. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de germinación del maíz azul para la elaboración de tesgüino.

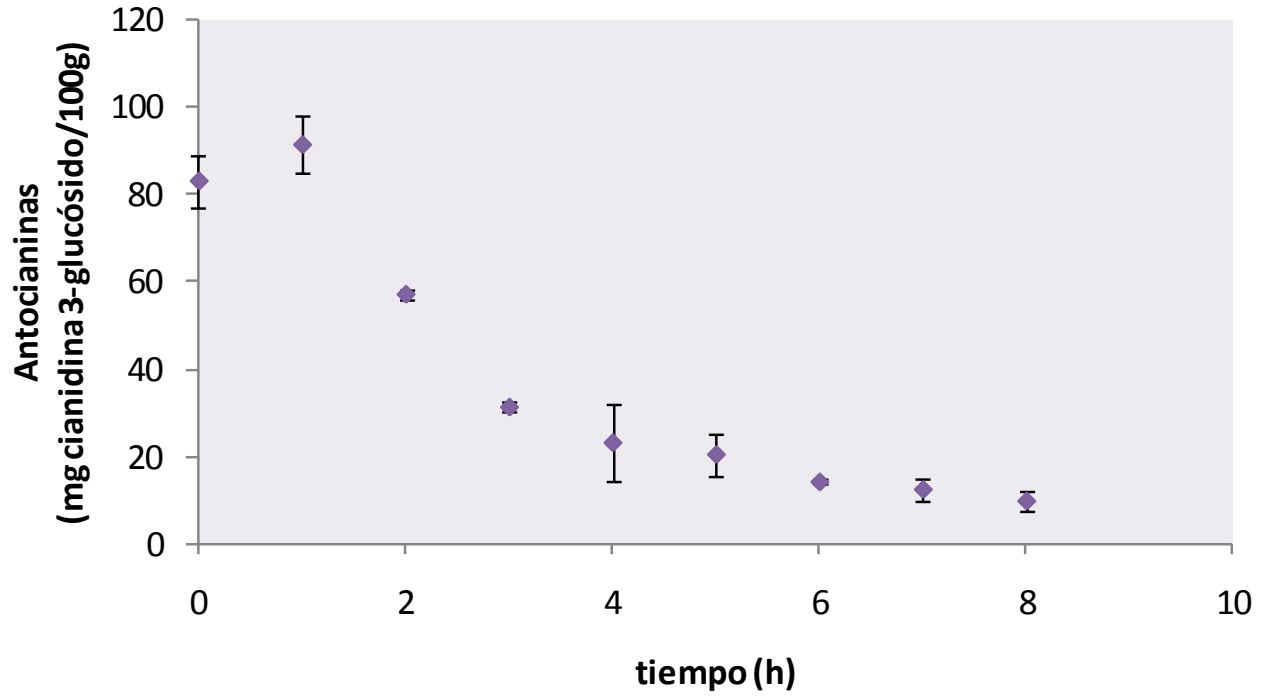


Figura 48. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de cocción del Lote 1 del germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

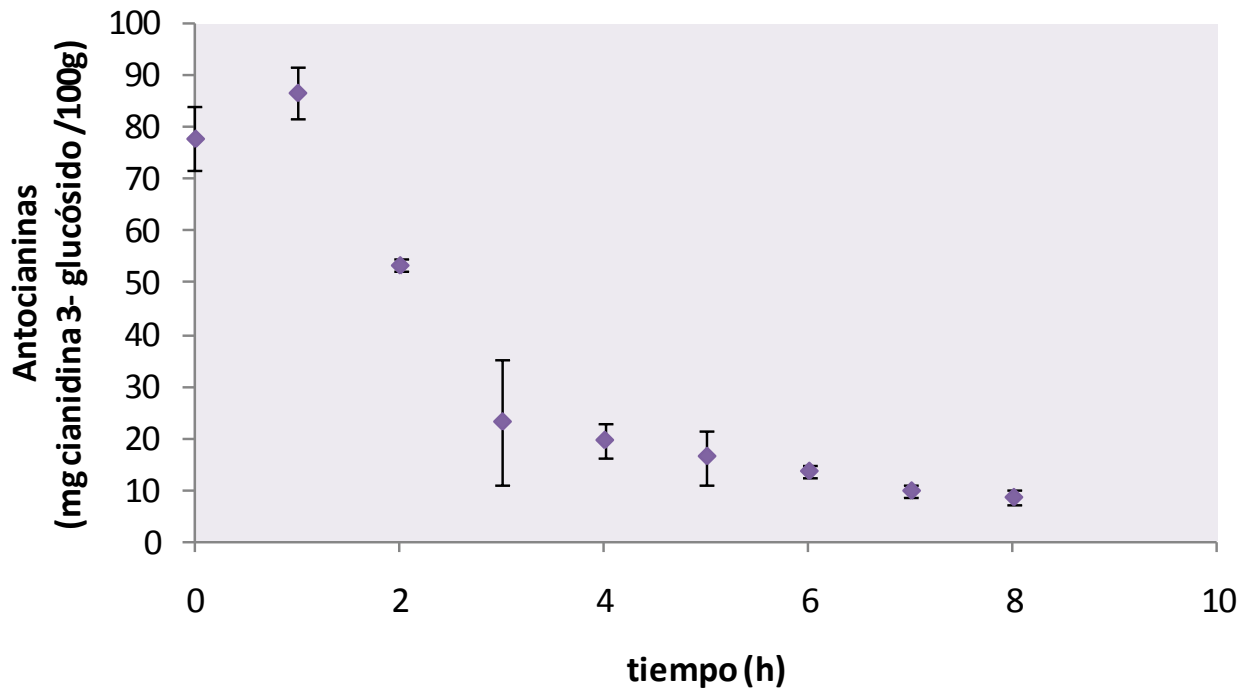


Figura 49 . Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de cocción del Lote 2 del germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

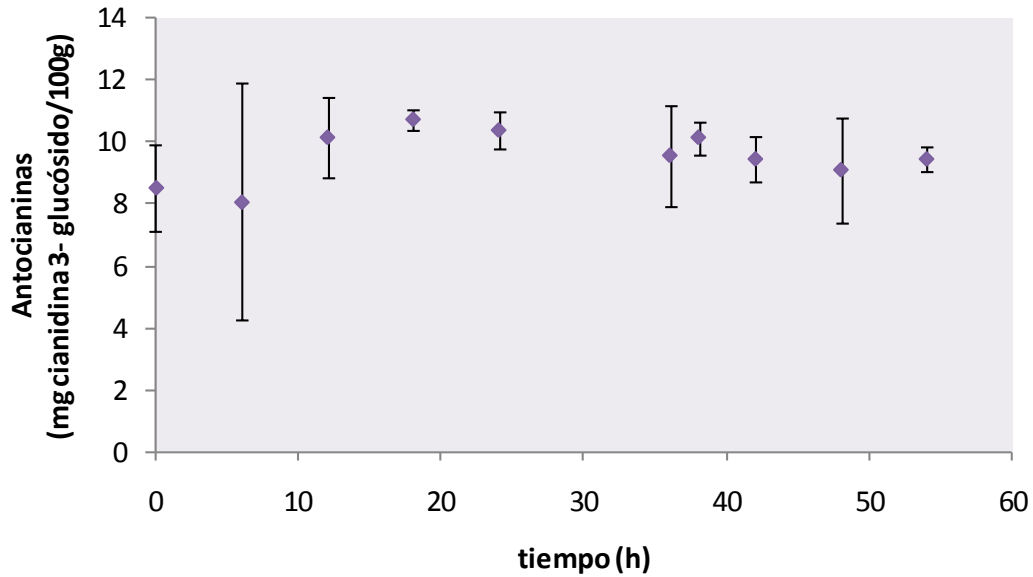


Figura 50. Gráfico de variación de antocianinas expresadas como cianidina 3-glucósido durante la etapa de fermentación para la elaboración de tesgüino de maíz azul.

Durante la etapa de fermentación (Figura 50), se observa que la cantidad de antocianinas permanece relativamente constante, variando solo de 9.80 a 9.45 mg de cianidina 3-glucósido por cada 100g de sólidos, posiblemente debido a que los microorganismos empleados no tienen actividad de α o β glucosidasa. En general, la cantidad de antocianinas disminuye cerca de 80% con respecto a la cantidad inicial a pesar de aumentar 43% durante el proceso de germinación. En la Figura 51 se resumen los cambios de antocianinas en cada etapa del proceso.

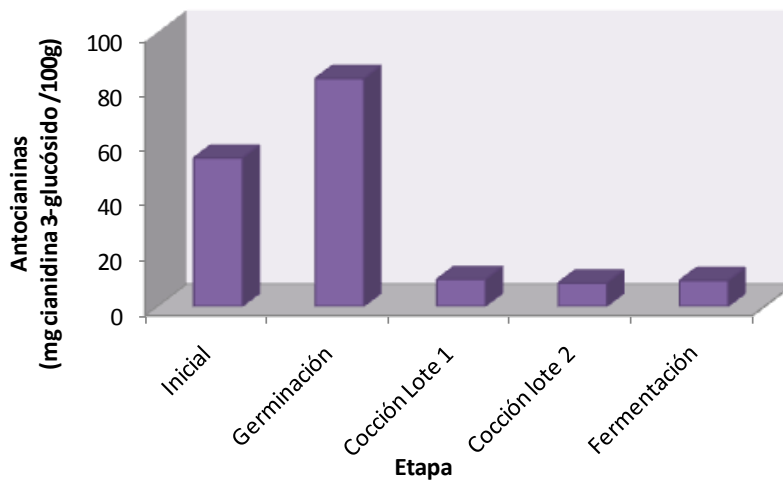


Figura 51. Contenido de antocianinas máximo durante las cuatro etapas principales del proceso de elaboración de tesgüino.

9.8. Cambios en la capacidad de secuestro de radicales libres durante el proceso de elaboración del tescüino.

En el caso de la determinación de actividad antioxidante, en una primera serie de muestras tratadas con la técnica de DPPH, se observó que el pH del extracto afecta de forma considerable la determinación tal y como lo reportan Borkowski y col. (2005). En pH cercano a 1 (el de los extractos tanto de antocianinas como de fenoles), la extinción del radical libre es prácticamente espontánea aún si las pruebas se realizan usando la solución extractora solamente, debido a esto, se hicieron pruebas para observar a que pH no se promueve la extinción del radical y se encontró que en pH cercano a 5, el radical es lo suficientemente estable para realizar las determinaciones (Figura 52). Ya que la extracción de antocianinas requiere de pH cercanos a 1 pues es donde se obtuvieron los valores mayores de extracción (donde son más estables), los pH se ajustaron a 5 con NaOH 3 N después de obtenido el extracto, sin embargo, ya que los extractos se obtienen en soluciones alcohólicas, al adicionar la solución acuosa de NaOH se tornaron opacos por lo que se decidió, realizar extracciones por separado para esta determinación las cuales se llevaron a cabo con etanol absoluto sin acidificar.

En el caso del radical ABTS+, se llevaron a cabo pruebas a distintos pH para verificar su estabilidad mostrando variaciones apenas perceptibles entre un pH y otro (Figura 53), por ello, las extracciones para esta determinación se llevaron a cabo en etanol acidificado (pH 1).

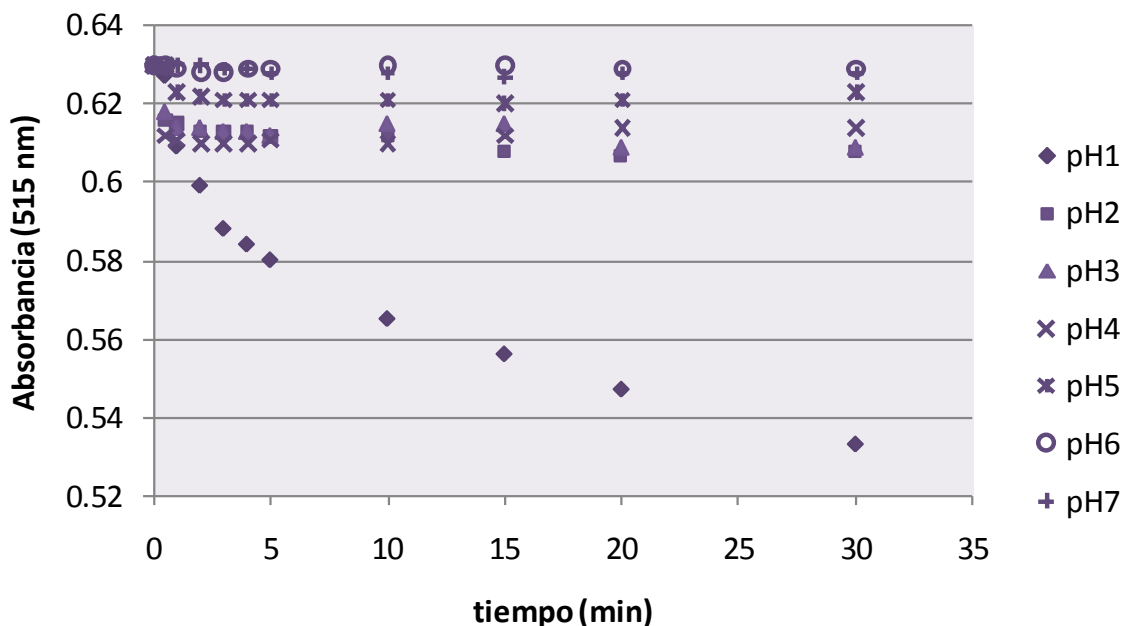


Figura 52. Estabilidad del radical DPPH con respecto al pH

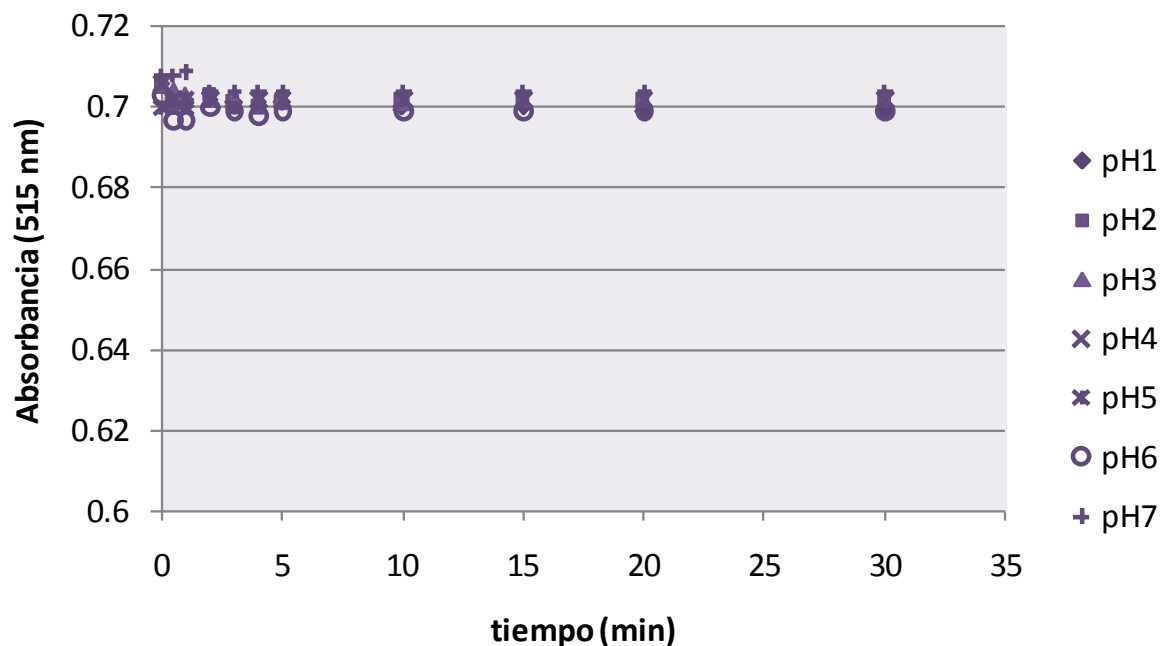


Figura 53. Estabilidad del radical ABTS⁺ con respecto al pH

Se realizaron las curvas de % de inhibición de cada radical con respecto a diferentes concentraciones de Trolox (Figuras 54 y 55), antioxidante artificial usado como referencia para determinar los equivalentes de trolox de distintas sustancias secuestrantes de radicales libres.

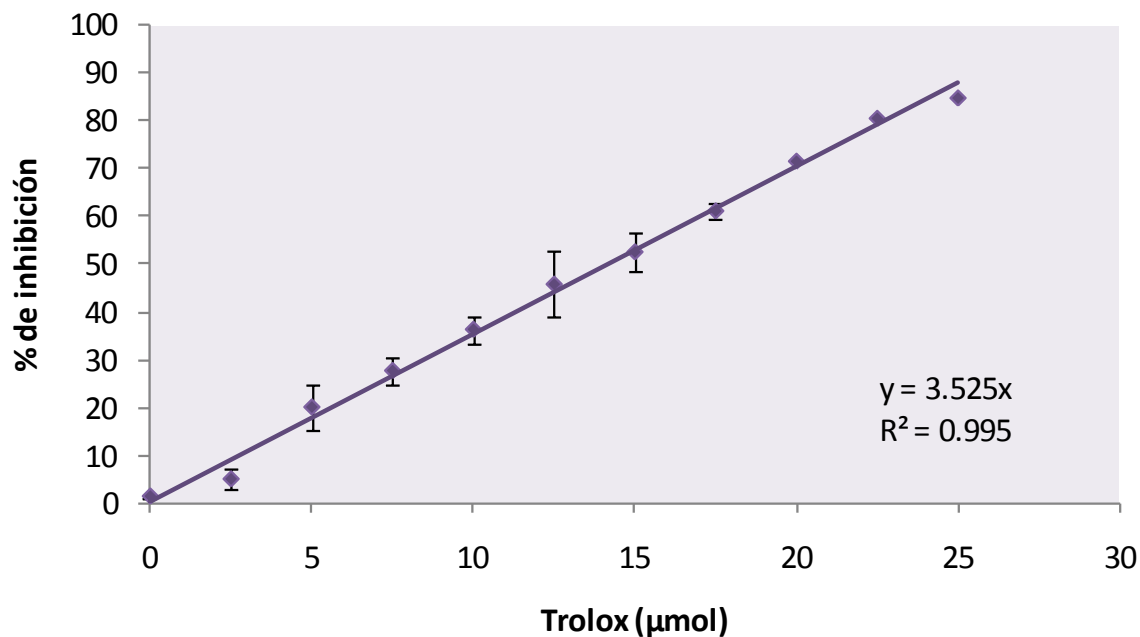


Figura 54. Porcentaje de inhibición del radical DPPH⁺ con respecto a la concentración de TROLOX.

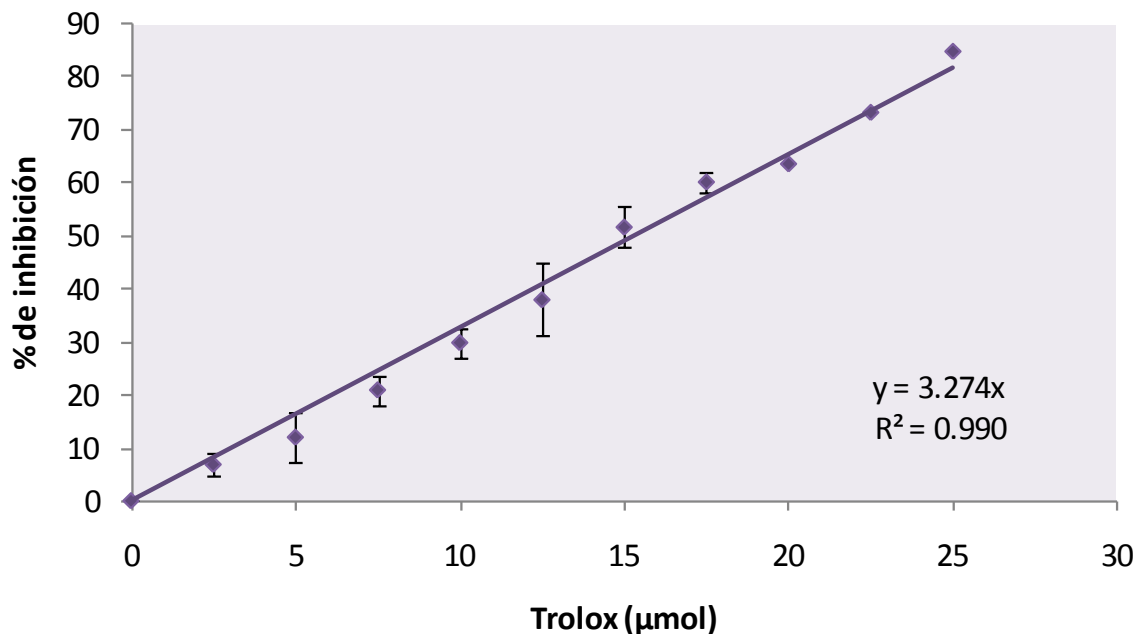


Figura 55. Porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ con respecto a la concentración de TROLOX.

El % de inhibición fue calculado midiendo la absorbancia de un testigo (sin decoloración o 0% de inhibición) y la de la muestra.

En las Figura 56 se muestran las variaciones del porcentaje de inhibición de los radicales DPPH[•] y ABTS⁺ en relación a la concentración de antocianinas y compuestos fenólicos durante la germinación de tesgüino, como se puede observar, existe una relación directa entre la cantidad de dichos fitoquímicos y la actividad de secuestro de radicales libres (ASRL), como ya se mencionó con anterioridad, estos compuestos aumentan durante la germinación aumentando a la par la a ASRL. En las Figuras 57 y 58 se muestra de forma individual la ASRL expresada como % de inhibición y μmol de trolox equivalentes por gramo, puede notarse que para ambos radicales la tendencia es similar, lo mismo se observa en la Figura 59 en que además puede observarse que la ASRL medida en función del ABTS⁺, registra valores menores de μmol de trolox equivalentes, ésta tendencia se observó en todas las etapas.

Durante la cocción hay una disminución en la ASRL a la par de la disminución en la concentración de los compuestos fenólicos y las antocianinas (Figuras 60-67), la misma tendencia se observa en los dos lotes; en la fermentación aumenta por efecto del aumento en compuestos fenólicos principalmente (Figuras 68-71).

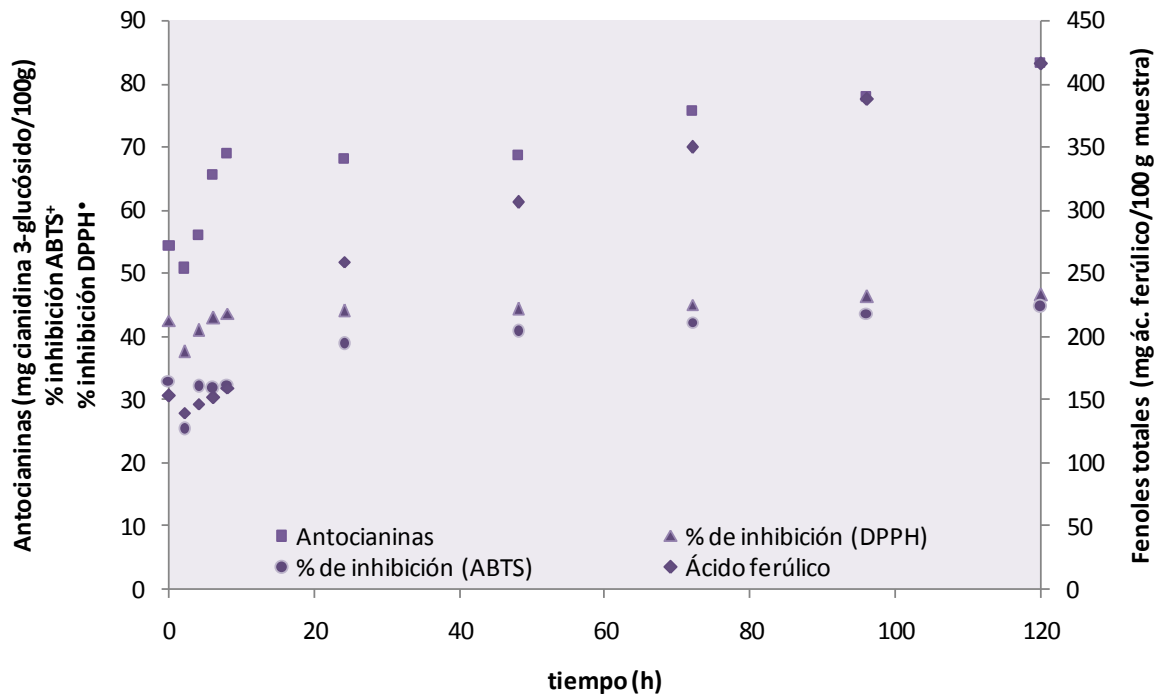


Figura 56. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

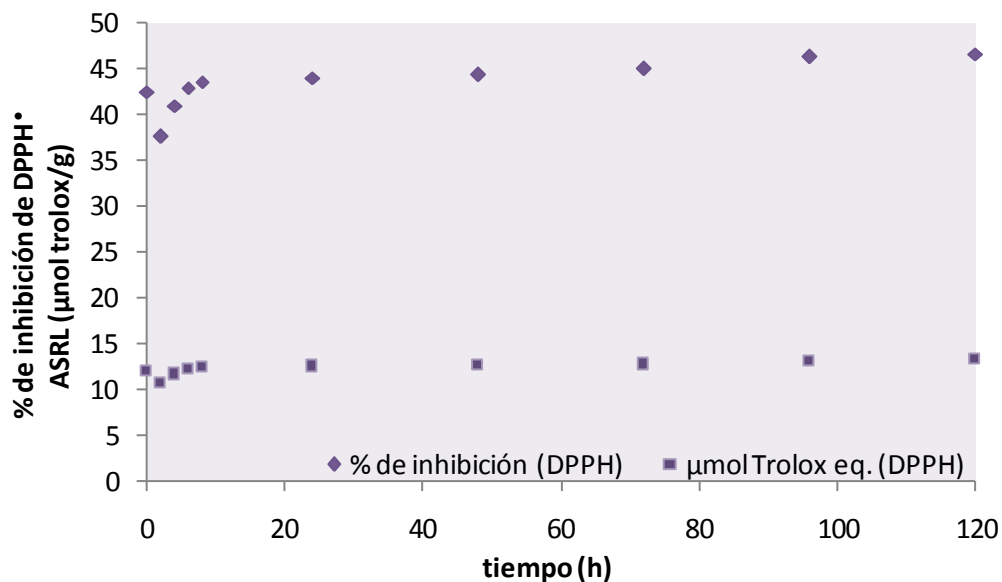


Figura 57. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres DPPH[•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

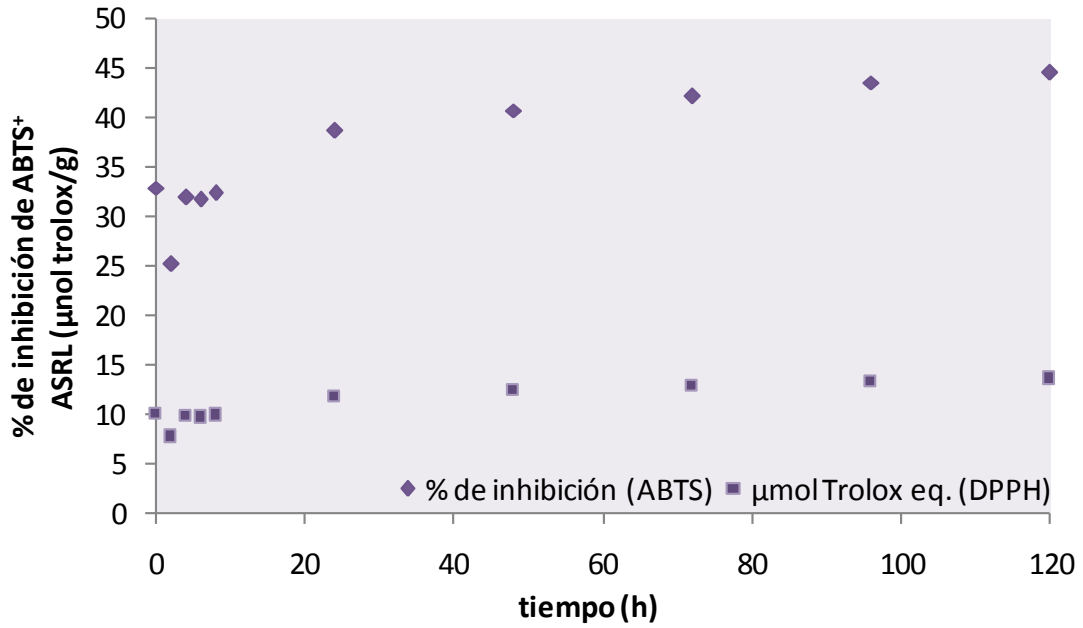


Figura 58. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres $ABTS^+$ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

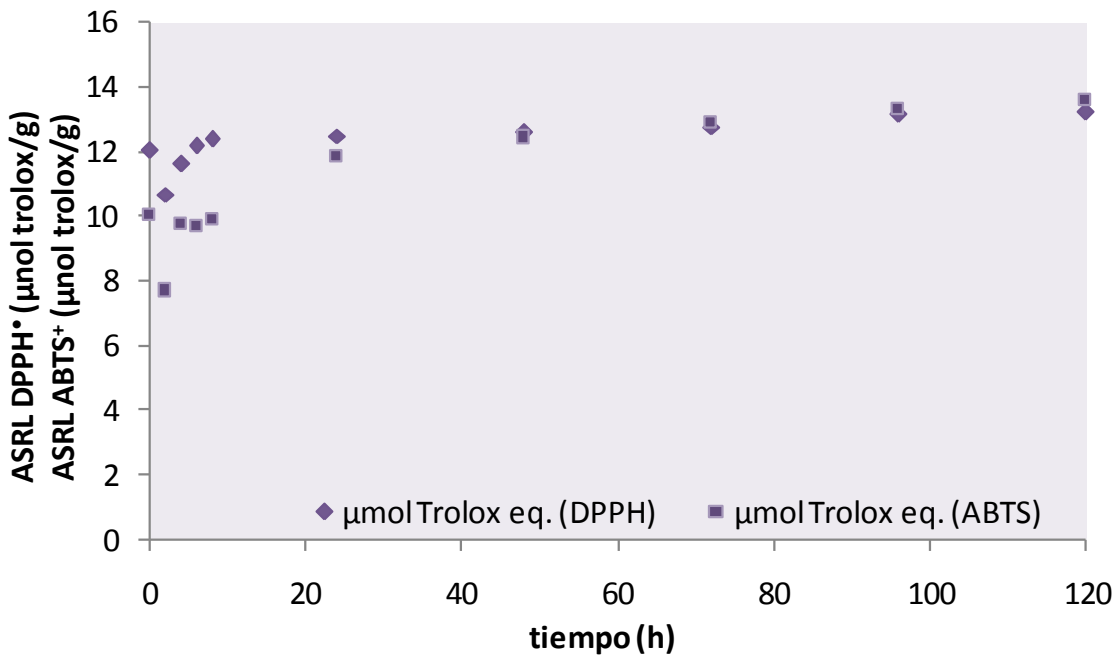


Figura 59. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres ($DPPH^*$ y $ABTS^+$) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la germinación de granos de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

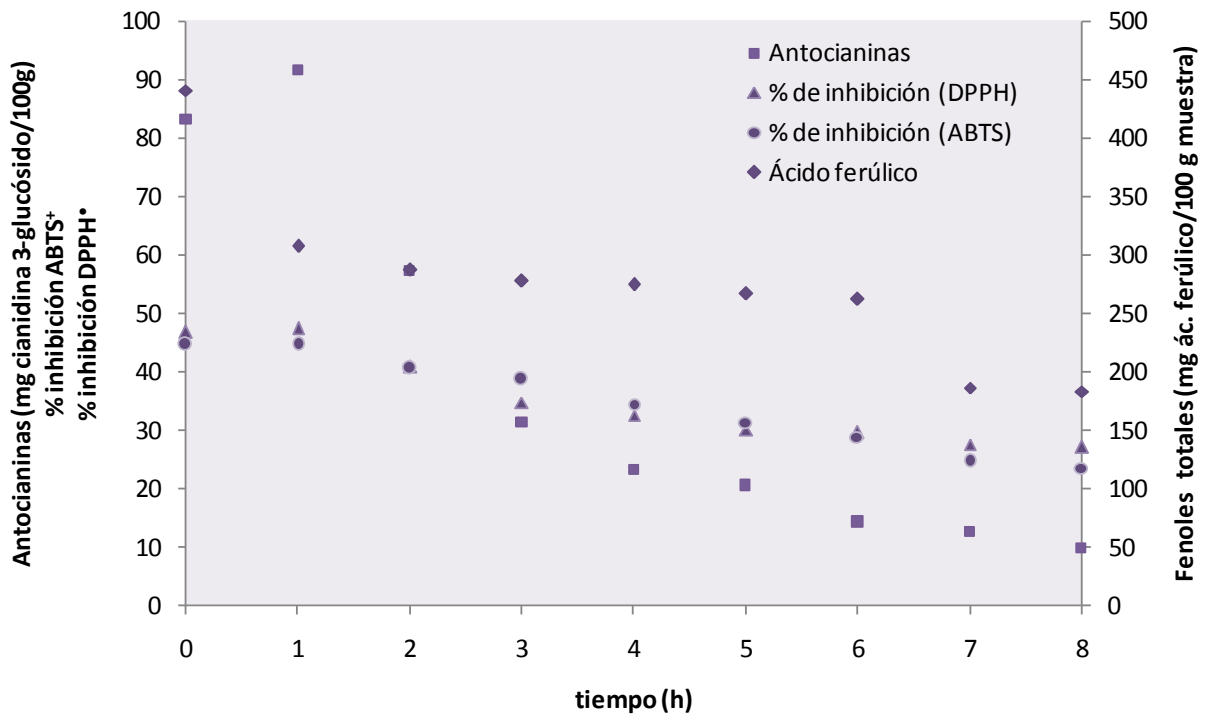


Figura 60. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

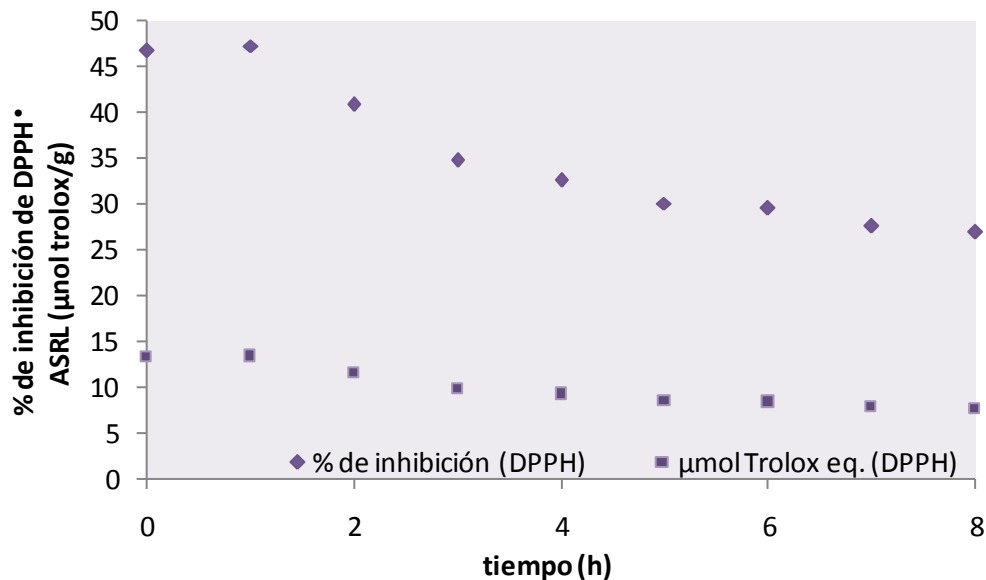


Figura 61. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres DPPH[•] y como µmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

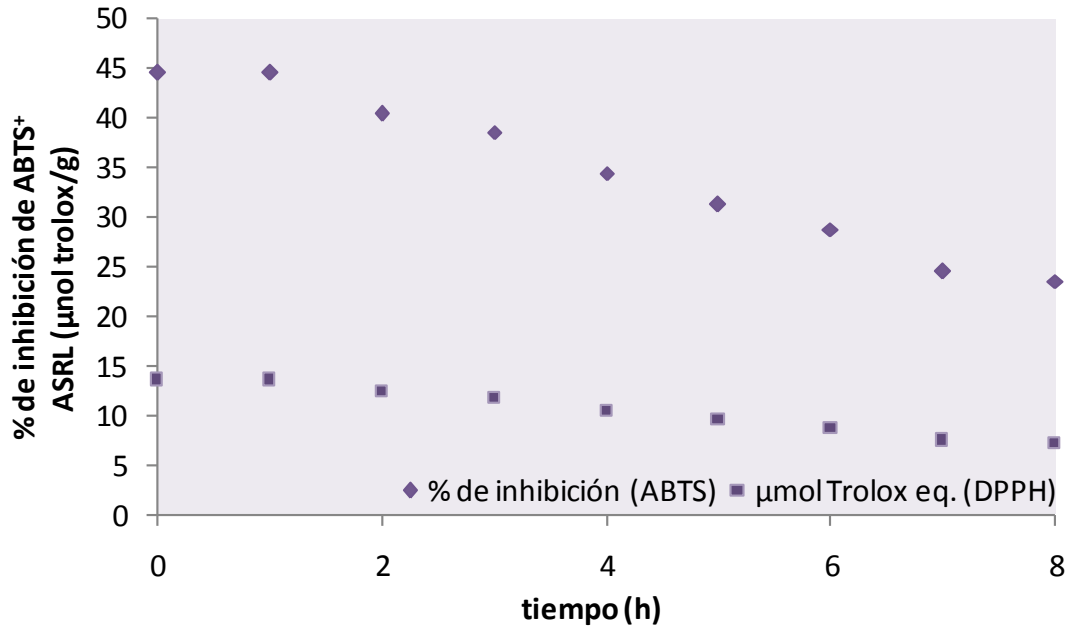


Figura 62. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres $ABTS^+$ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

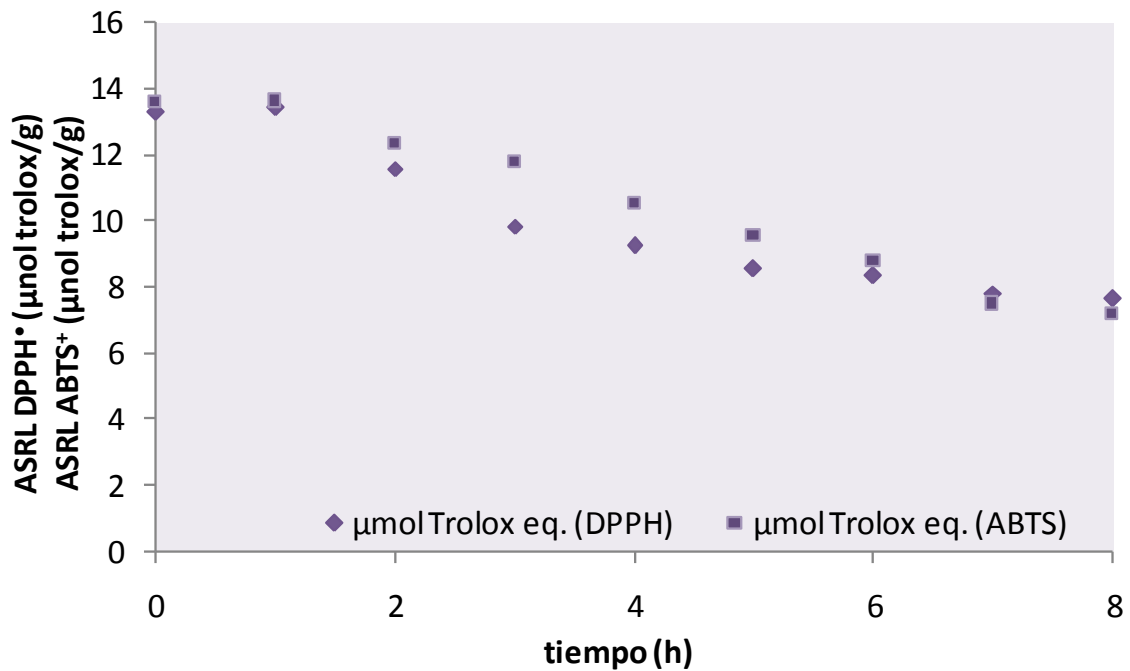


Figura 63. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres ($DPPH^*$ y $ABTS^+$) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 1) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

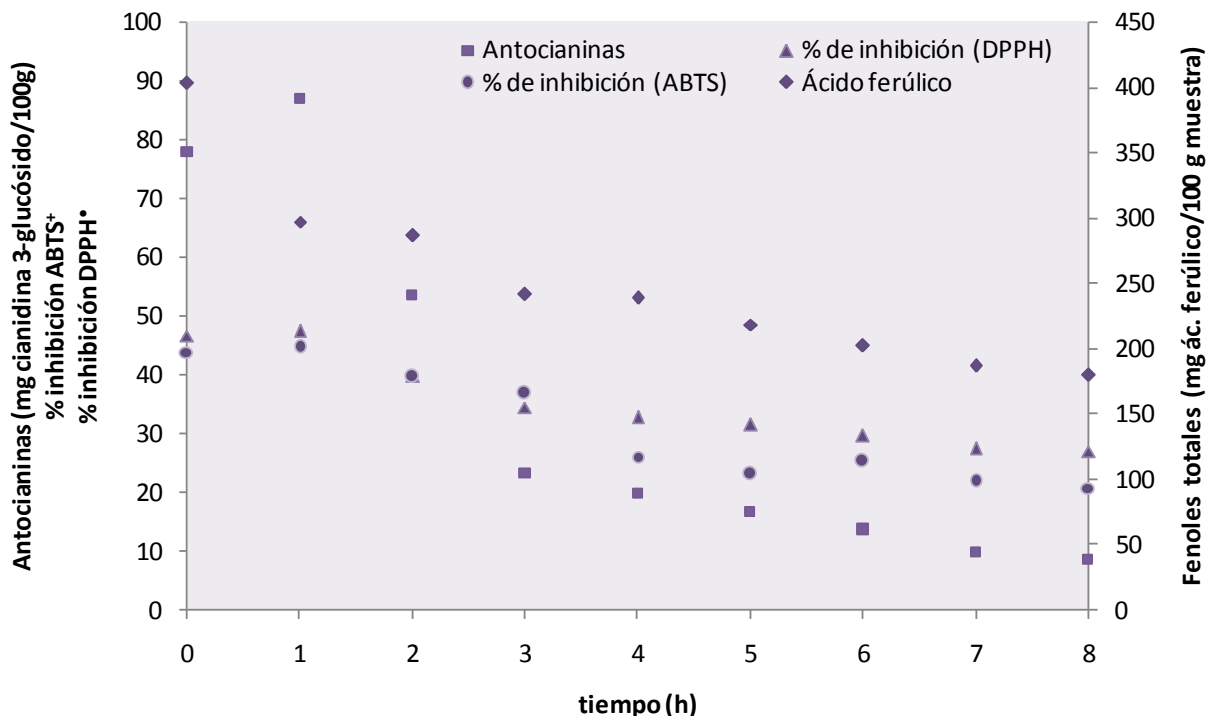


Figura 64. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS[•] comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

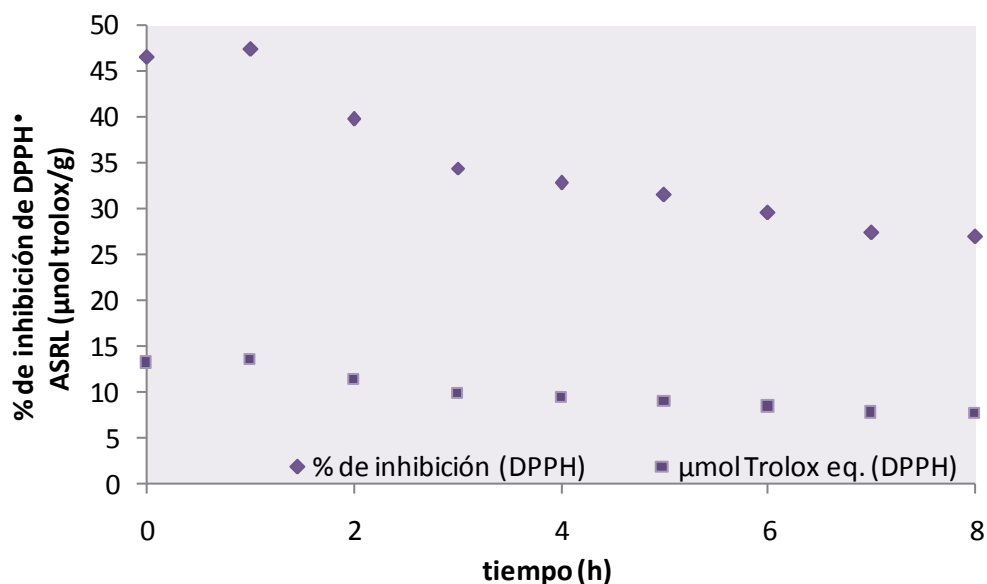


Figura 65. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libre DPPH[•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

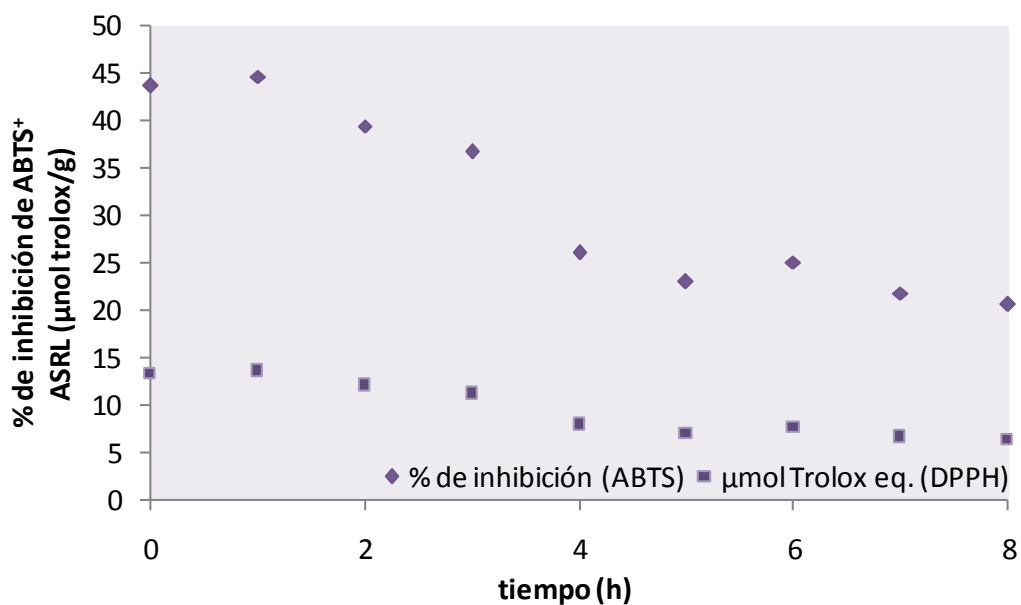


Figura 66. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres $ABTS^+$ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

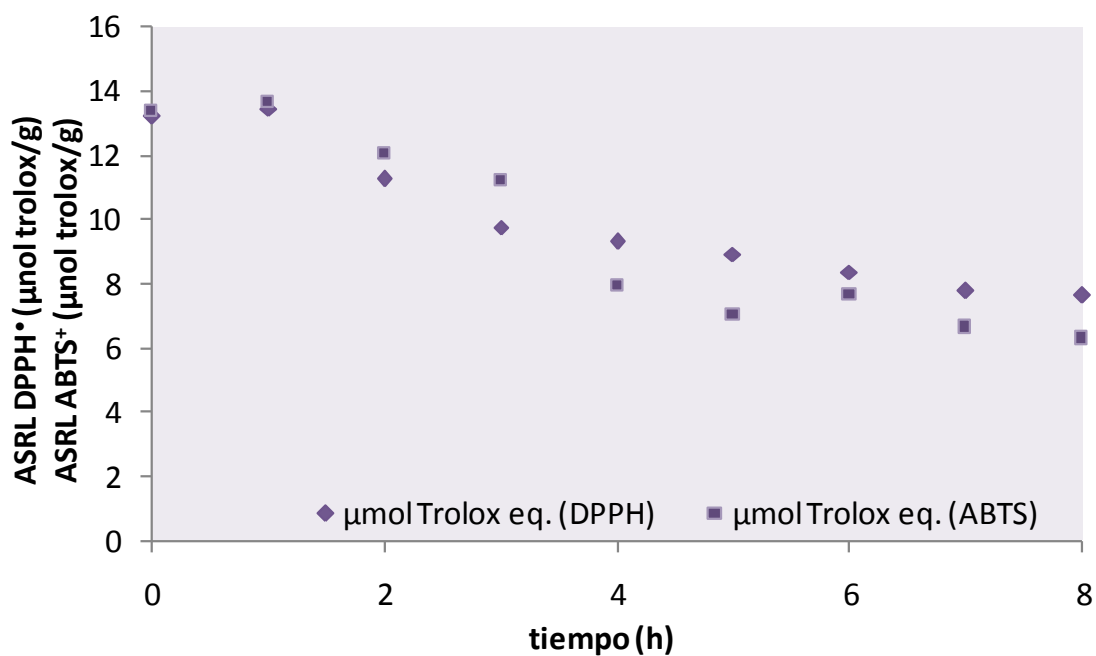


Figura 67. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres ($DPPH^\circ$ y $ABTS^+$) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la cocción (lote 2) de germinado de maíz azul para la elaboración de tesgüino.

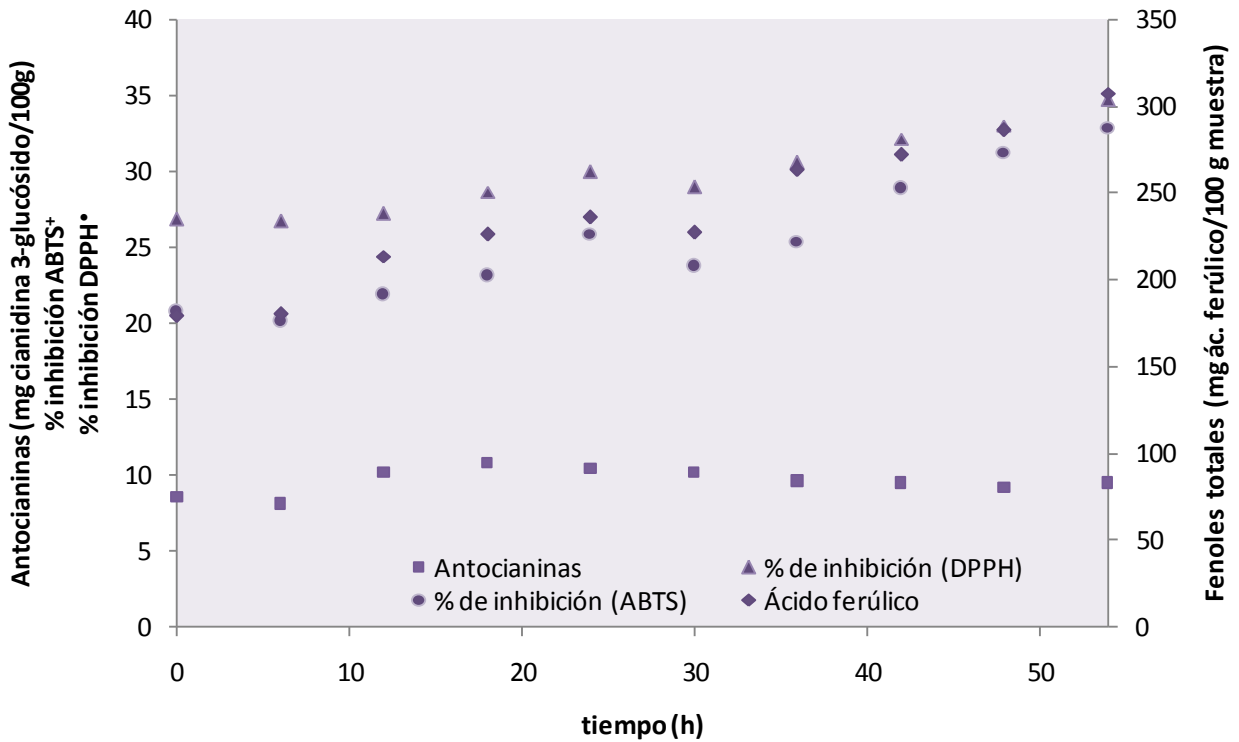


Figura 68. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición de los radicales libres DPPH[•] y ABTS⁺ comparada con la concentración de antocianinas (expresadas como cianidina 3-glucósido) y compuestos fenólicos totales (expresados como ácido ferúlico) durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesguino.

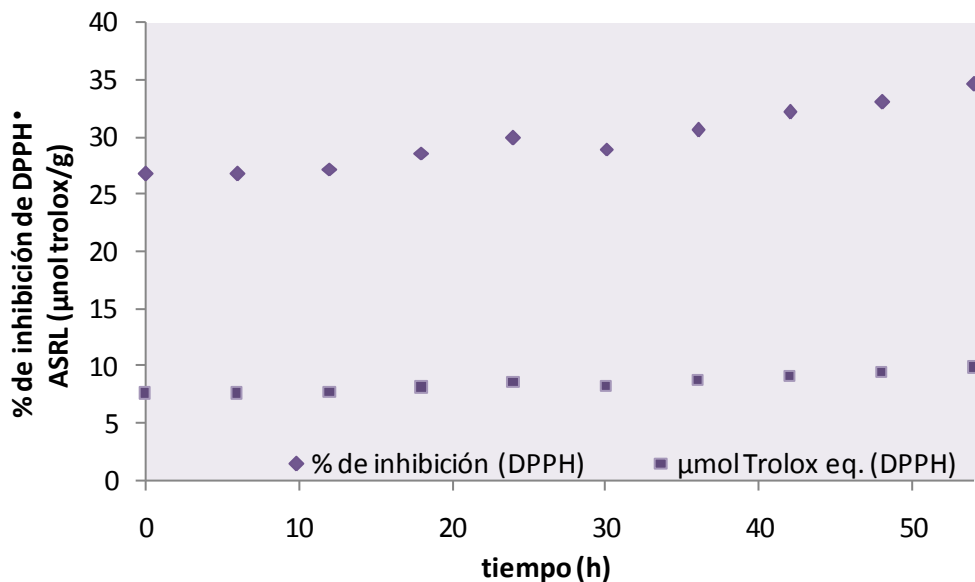


Figura 69. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres DPPH[•] y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesguino.

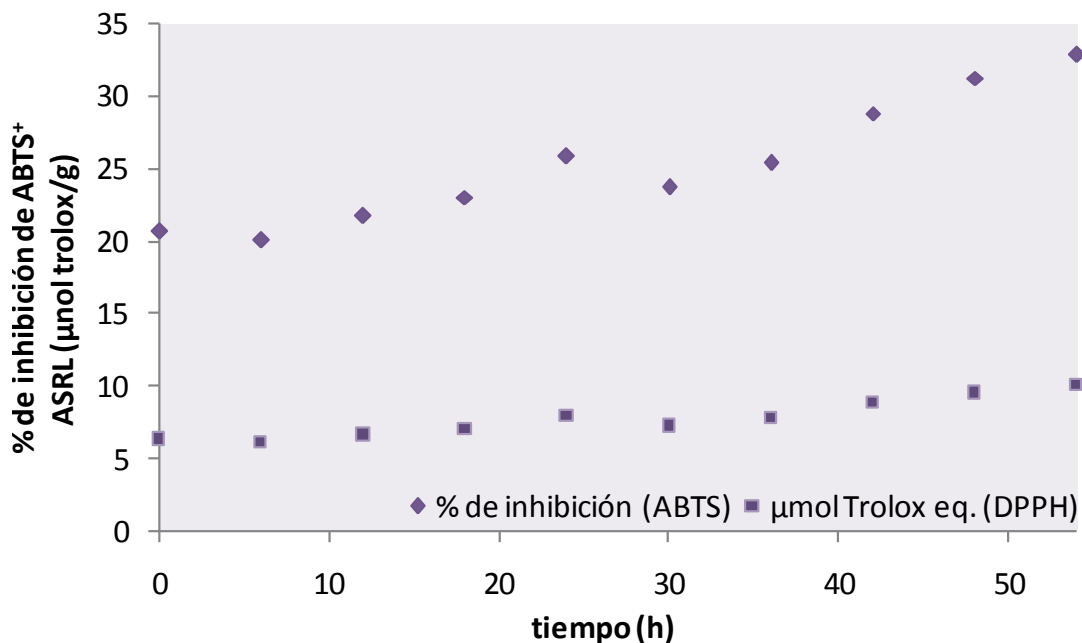


Figura 70. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como porcentaje de inhibición del radical libres $ABTS^+$ y como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.

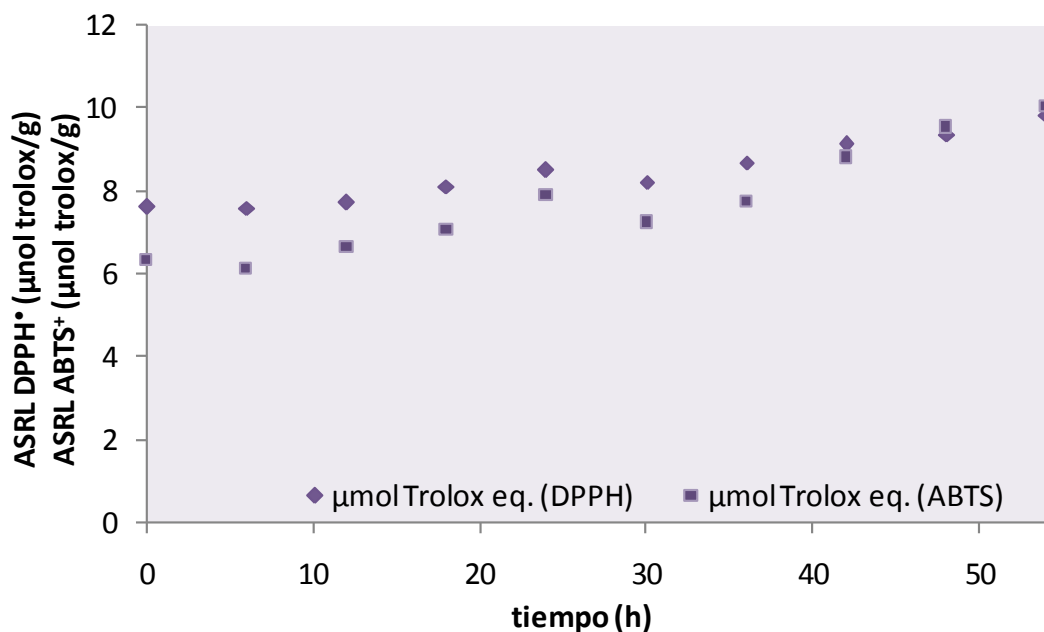


Figura 71. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres ($DPPH^*$ y $ABTS^+$) expresada como μmol de trolox por gramo de muestra durante la fermentación de maíz azul germinado y cocido para la elaboración de tesgüino.

En el caso de la ASR DPPH*, se observa un disminución global del 20%, sin embargo en el caso de la ASR ABTS+, dicha disminución es apenas perceptible, cabe mencionar que en esta determinación, los cambios en absorbancia son apenas detectables, lo que aumenta el nivel de incertidumbre de la prueba. Del Pozo y col. (2006) encontraron disminuciones en la capacidad antioxidante de 12%, 24% y 49% entre el maíz azul mexicano usado como materia prima y el maíz nixtamalizado, tortillas y totopos respectivamente. La Figura 72 muestra los cambios globales en la actividad antioxidante durante el procesamiento del maíz azul para la elaboración de tesgüino, se pueden observar las tendencias antes señaladas.

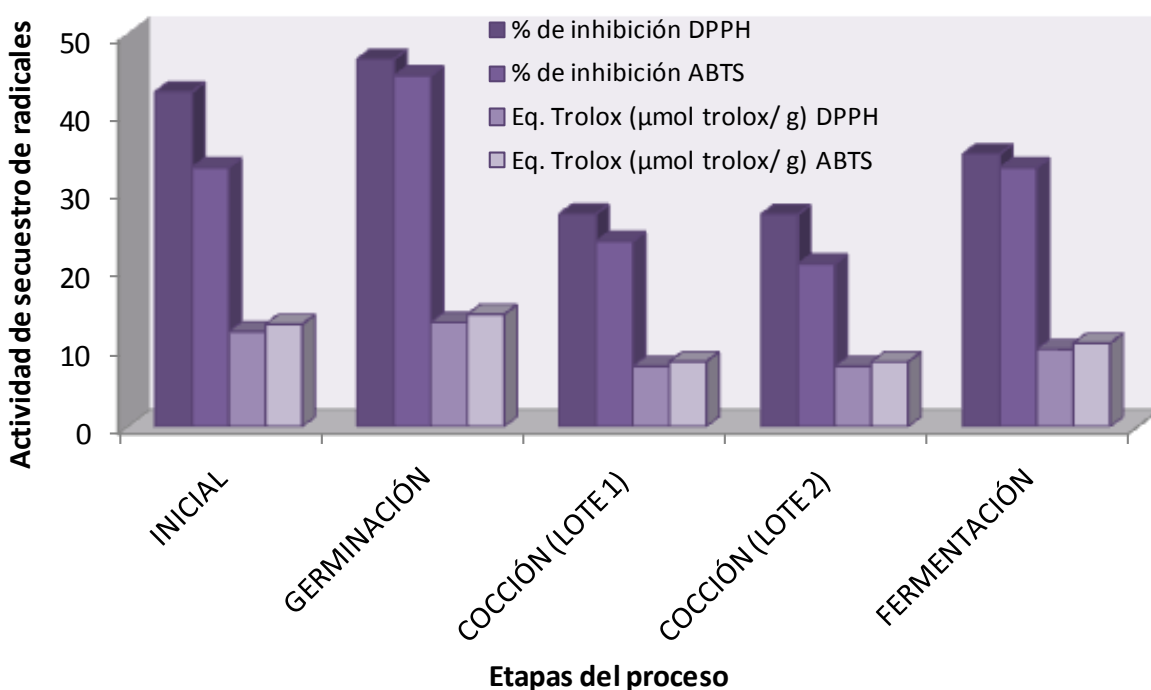


Figura 72. Actividad antioxidante expresada como % de inhibición del radical libre DPPH* en las diferentes etapas de elaboración de tesgüino de maíz azul.

9.9. Cambios de color durante el proceso de elaboración de tesgüino.

En la tabla 18 se muestran los diferentes valores obtenidos en la determinación de color del maíz azul durante el proceso de germinación, los valores al tiempo 0h corresponden al maíz sin tratamiento, los valores obtenidos, al ser comparados con los reportados por Salinas (2003) que para maíz azul son: Luminosidad (L) de 64.31, un valor de a de 1.68 y de b de 1.52, se observa que L es muy similar mientras que a y b son menores, en el caso de a, ambos son positivos, lo que corresponde a tonalidades rojas mientras que para b, el valor obtenido en este

trabajo es negativo lo cual corresponde a tonalidades azules, mientras que en los reportados por Salinas es positivo, es decir hacia las tonalidades amarillas.

Como puede observarse en la Figura 73, conforme avanza el tiempo de germinación, la luminosidad disminuye en aproximadamente 10 unidades.

Con los parámetros L, a y b, fue calculada la diferencia de color (ΔE^*) en ésta etapa del proceso arrojando un valor de 11.3

Además se calcularon los valores de Tono y Saturación cuyas variaciones se muestran en las Figuras 75 y 76. Como puede observarse, en el caso del tono aumenta durante la primera etapa de la germinación para posteriormente disminuir ligeramente.

En el caso de la saturación los valores son muy bajos, ubicándose dentro de la zona de los colores acromáticos, que son aquellos situados en la zona central del círculo cromático y que tienen tan poca saturación que no se aprecia en ellos el matiz original (Figura 73) (Moreno, 2004).

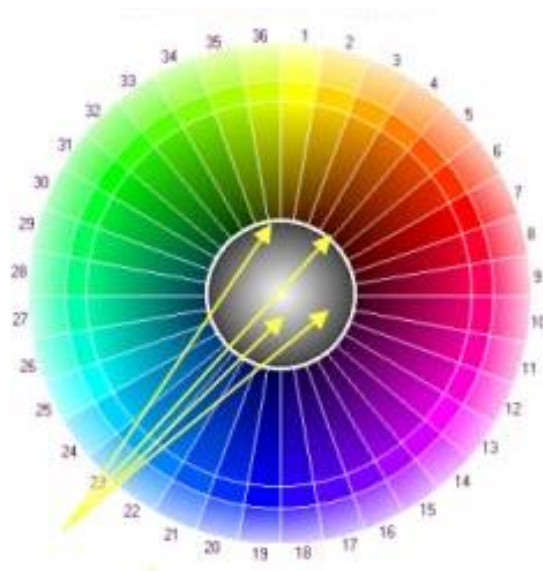


Figura 73. Representación de los colores acromáticos (Moreno, 2004).

Usando los parámetros X, Y y Z, fueron calculadas las coordenadas x y y que al ser medidas en el diagrama cromático (Figura 8) arrojaron los valores para longitud de onda presentados en la Tabla 18 cuyo promedio es de 557 nm (colores verdes).

Como se puede observar, las coordenadas son muy cercanas a las determinadas para el iluminante C, estando ubicadas dentro de la zona acromática antes mencionada.

Tabla 18. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de germinación del maíz azul utilizado en este trabajo.

	t(h)	L	a	b	X	Y	Z	ΔE^*	C*	H*	x	y	z	λ
GERMINACIÓN	0	71.96	0.48	-1.49	42.67	43.59	49.15	11.30	1.57	287.7	0.315	0.322	0.363	577.00
	24	67.65	0.92	-1.58	36.84	37.49	44.98		1.83	300.4	0.309	0.314	0.377	551.00
	48	68.01	1.24	-1.59	37.43	37.99	45.59		2.02	307.8	0.309	0.314	0.377	551.00
	72	64.87	1.72	-0.89	33.54	33.89	40.11		1.93	332.7	0.312	0.315	0.373	551.00
	96	63.70	1.84	-1.39	32.13	32.42	38.82		2.30	323	0.311	0.314	0.376	551.00
	120	60.93	1.31	-0.47	28.93	29.32	34.41		1.39	340.1	0.312	0.316	0.371	551.00
	168	60.69	1.28	-1.34	29.04	29.16	37.02		1.86	313.6	0.305	0.306	0.389	568.00

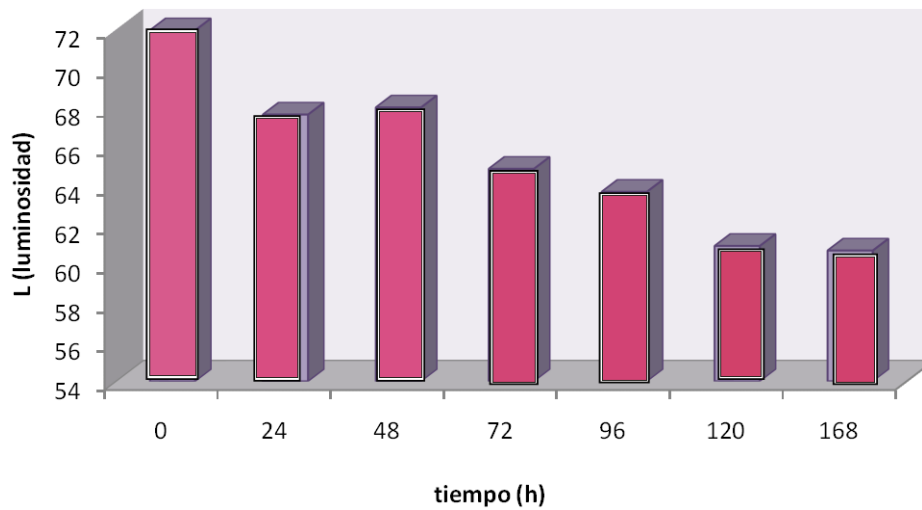


Figura 74. Variación de la luminosidad de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.

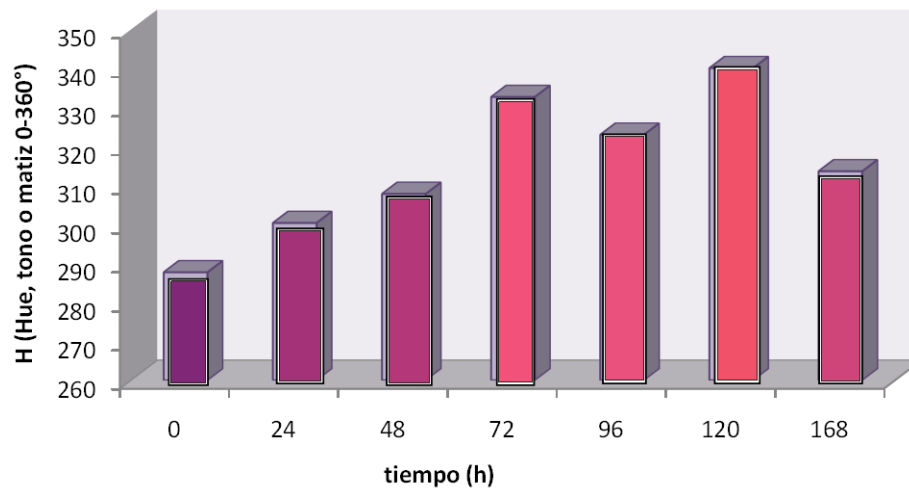


Figura 75. Variación del tono de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.

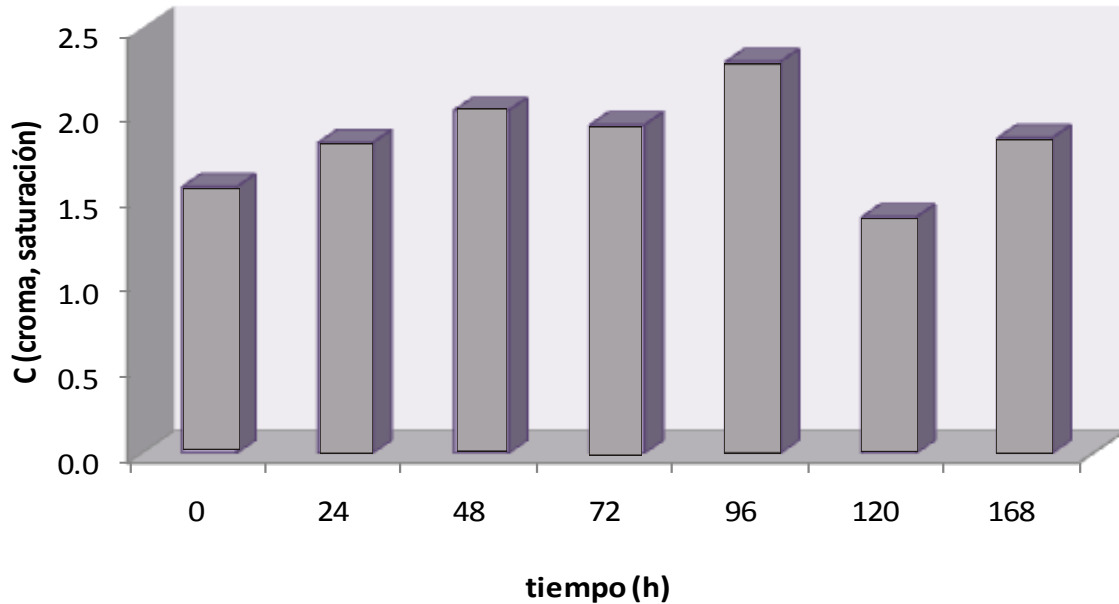


Figura 76. Variación de la saturación o croma de harina de maíz azul a diferentes tiempos de germinación del grano.

En la Tabla 19 se muestran los valores de color obtenidos y calculados para la etapa de cocción, como puede observarse, los valores de luminosidad continúan disminuyendo, aunque, como puede observarse en la Figura 77, los valores bajan principalmente en la primera hora del proceso, hay que recordar que durante esta etapa, la temperatura es en promedio de 88°C por lo que además de haber grandes pérdidas en pigmentos (Antocianinas), se llevan a cabo reacciones como las de Maillard que afectan el color del producto, de hecho, al inicio de la cocción se percibe un color morado en el atole y al llegar a 1h, el color se percibe café rojizo.

Durante esta etapa, el tono cambia hacia los rojizos y amarillos (Figura 78) y la saturación aumenta ligeramente (Figura 79) aunque no lo suficiente para dejar el círculo de los colores acromáticos.

En cuanto a la diferencia de color, entre las 0h y las 8h de cocción es de 20.28 unidades, esto casi el doble de la diferencia durante el proceso de germinación.

La longitud de onda, tiene un ligero aumento, en promedio en esta etapa es de 584 nm (amarillos), es decir, 30 nm más alta que en la etapa de germinación, mientras que los valores de a, éstos siguen siendo positivos (tonalidades rojas), sin embargo los valores de b cambian a después de los primeros 30 minutos de cocción, es decir pasa de las tonalidades azules a las amarillas (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de cocción del maíz azul utilizado en este trabajo.

	t(min)	L	a	b	x	y	z	ΔE^*	C*	H*	x	y	z	Λ
COCCIÓN	0	60.69	1.28	-1.34	29.04	29.16	37.02	20.28	1.86	313.6	0.305	0.306	0.389	568.00
	0.5	41.48	2.91	-1.38	12.20	12.07	14.61		3.22	334.7	0.314	0.310	0.376	502.50
	1	41.97	3.01	0.21	12.61	12.48	14.42		3.02	4.035	0.319	0.316	0.365	625.00
	1.5	42.65	3.48	1.04	13.06	12.85	14.47		3.63	16.62	0.323	0.318	0.358	595.00
	2	42.47	3.60	1.32	13.03	12.80	14.29		3.83	20.16	0.325	0.319	0.356	595.00
	2.5	42.93	3.86	1.77	13.32	13.11	14.44		4.25	24.6	0.326	0.321	0.353	595.00
	3	42.94	4.23	2.26	13.44	13.12	14.24		4.80	28.1	0.329	0.322	0.349	595.00
	3.5	42.62	3.26	2.82	12.88	12.70	13.55		4.31	40.84	0.329	0.325	0.346	589.00
	4	42.63	3.53	2.89	13.10	12.88	13.72		4.56	39.28	0.330	0.325	0.346	589.00
	4.5	42.52	3.93	3.39	12.92	12.64	13.25		5.19	40.74	0.333	0.326	0.341	589.00
	5	42.65	3.80	3.56	12.99	12.74	13.28		5.20	43.09	0.333	0.327	0.340	582.00
	5.5	42.81	3.67	3.85	13.33	13.12	13.55		5.32	46.41	0.333	0.328	0.339	582.00
	6	42.54	3.80	4.22	12.94	12.69	12.96		5.68	48.03	0.335	0.329	0.336	585.00
	6.5	42.31	3.67	4.17	12.87	12.63	12.91		5.56	48.67	0.335	0.329	0.336	585.00
	7	42.41	3.415	3.9	13.1	12.9	13.31		5.18	48.79	0.333	0.328	0.339	582.00
7.5	41.84	3.35	4.20	12.84	12.42	12.65		5.38	51.42	0.339	0.328	0.334	590.00	
8	41.58	3.62	5.04	12.46	12.48	12.15		6.20	54.27	0.336	0.336	0.328	580.00	

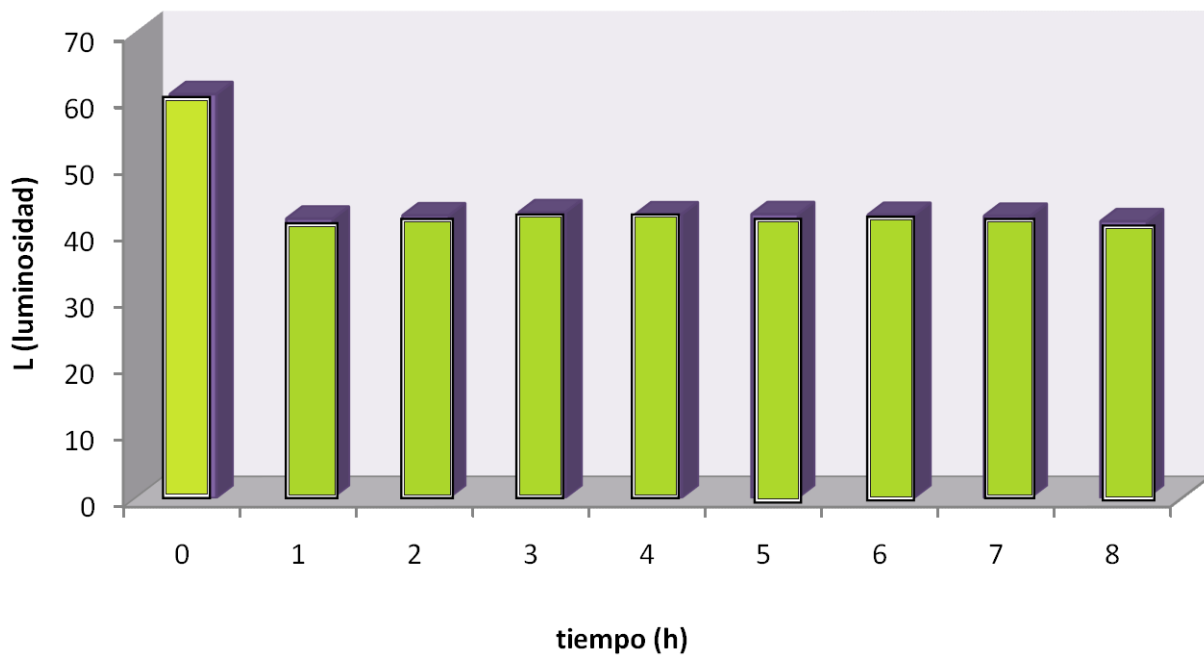


Figura 77. Variación de la luminosidad de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.

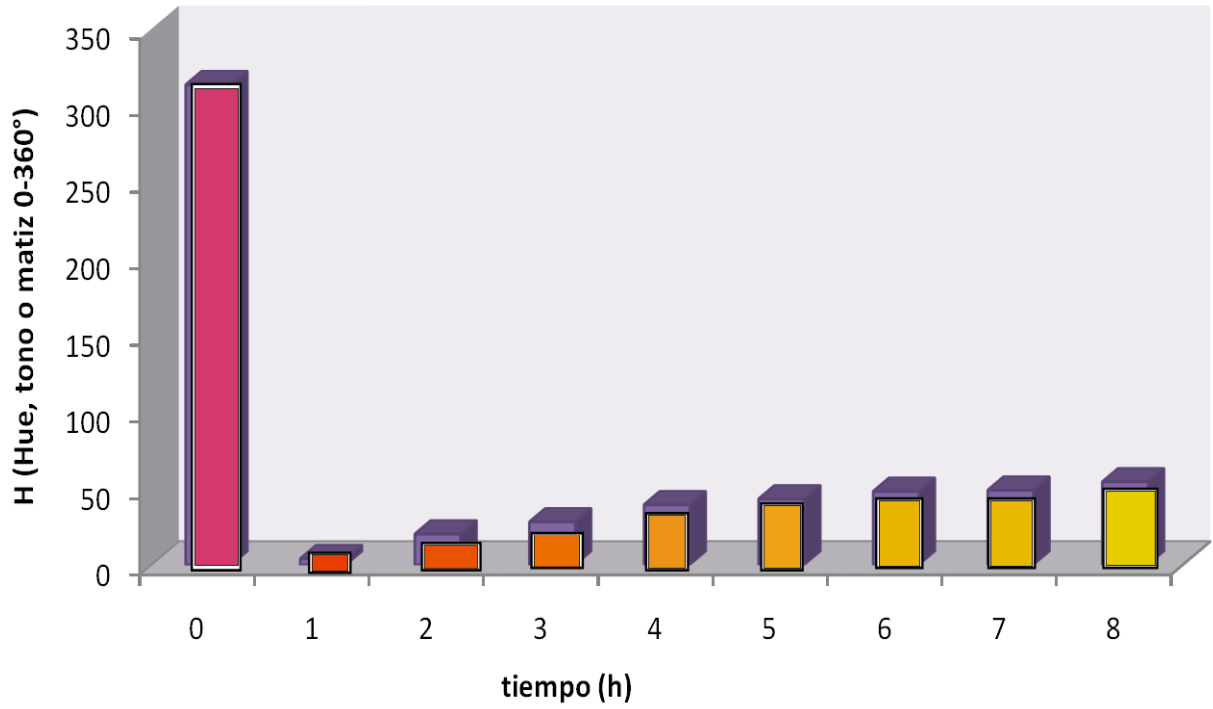


Figura 78. Variación del tono o matiz de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.

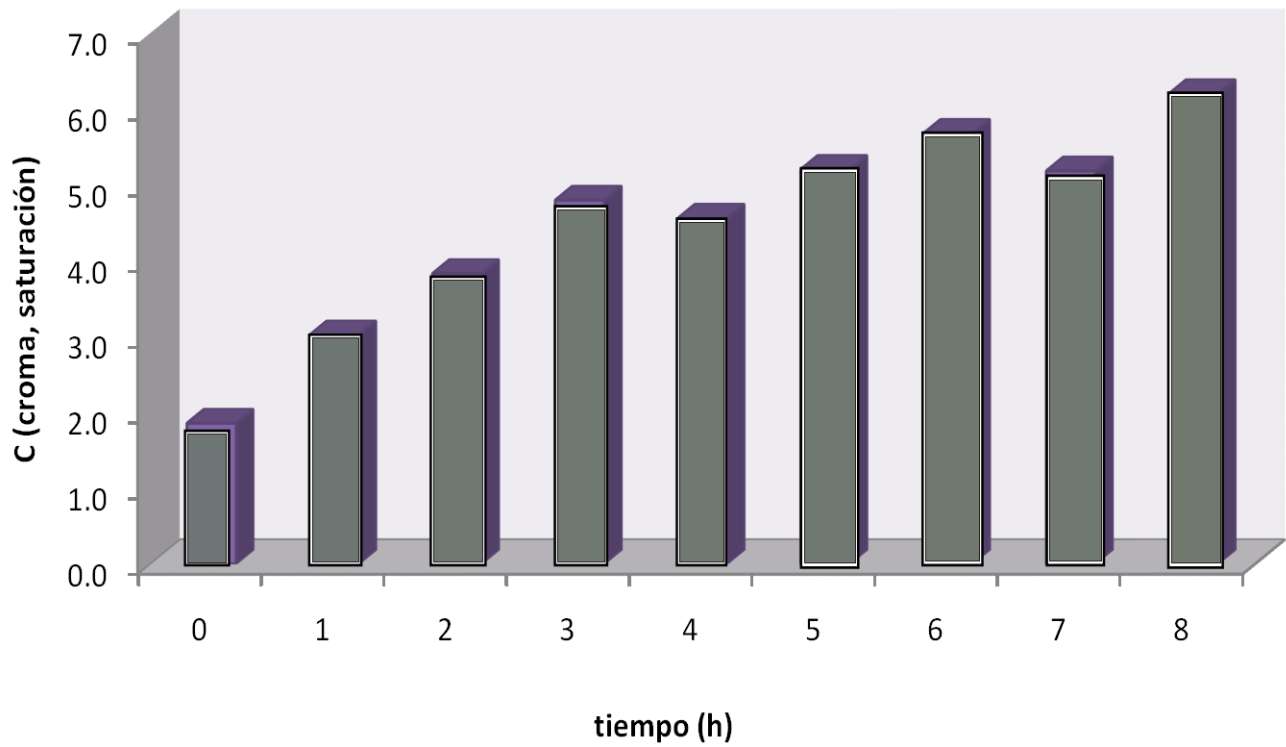


Figura 79. Variación del croma o saturación de atole de maíz azul a diferentes tiempos de cocción.

Los datos de color obtenidos para la etapa de fermentación se muestran en la Tabla 20, se puede observar que en esta etapa, la diferencia de color es mucho menor que en las anteriores (aproximadamente 4 unidades), los valores de a y b se mantienen positivos y la longitud de onda aumenta ligeramente durante el proceso (hasta el t=48h).

En la Figura 80 se muestran los cambios en luminosidad, ésta aumenta ligeramente durante esta etapa de procesamiento.

En cuanto al tono (Figura 81), éste cambia de los amarillos a los rojizos nuevamente lo cuál puede ser percibido pues el fermentado cambia de un color café rojizo a uno ligeramente rosado al apreciarlo visualmente.

Durante esta etapa de proceso, la saturación (Figura 82) permanece relativamente constante de acuerdo a las mediciones instrumentales.

Cabe mencionar que, durante todo el proceso, al apreciar visualmente la muestra, sí se perciben cambios sensoriales en el color del maíz, estos van desde grises con tonos violáceos en la muestra sin procesar, a morados al comenzar el calentamiento durante la cocción, a café rojizo al terminarla y hasta el producto terminado de color ligeramente rosado (debido al cambio en el pH del medio, las antocianinas remanentes de la cocción cambian su conformación y por tanto su coloración) lo cual hace alusión a las limitaciones instrumentales para medir percepciones humanas (Torricella y col., 2007)

Tabla 20. Parámetros de color obtenidos durante la etapa de fermentación del maíz azul utilizado en este trabajo.

	t(h)	L	a	b	x	y	z	ΔE^*	C*	H*	x	y	z	λ
FERMENTACIÓN	0	41.58	3.62	5.03	12.46	12.48	12.15	3.98	.20	54.27	0.336	0.336	0.328	580.00
	6	40.76	2.31	2.28	11.75	11.71	12.68		3.24	44.67	0.325	0.324	0.351	587.00
	12	40.66	2.81	2.62	11.76	11.63	12.47		3.84	42.96	0.328	0.324	0.348	587.00
	18	41.78	4.66	2.54	12.72	12.35	13.28		5.31	28.58	0.332	0.322	0.346	594.00
	24	42.54	5.77	2.48	13.41	12.85	13.85		6.28	23.27	0.334	0.320	0.345	568.00
	30	42.68	5.45	2.68	13.56	13.03	13.54		6.07	26.19	0.338	0.325	0.337	596.00
	36	42.81	5.63	3.71	13.56	13.03	13.54		6.74	33.4	0.338	0.325	0.337	596.00
	42	43.15	5.70	2.78	13.76	13.31	13.89		6.34	26.03	0.336	0.325	0.339	596.00
	48	43.26	5.70	3.34	13.87	13.32	14.01		6.61	30.37	0.337	0.323	0.340	588.00
	54	43.97	5.76	2.67	14.38	13.91	14.79		6.35	24.87	0.334	0.323	0.343	580.00

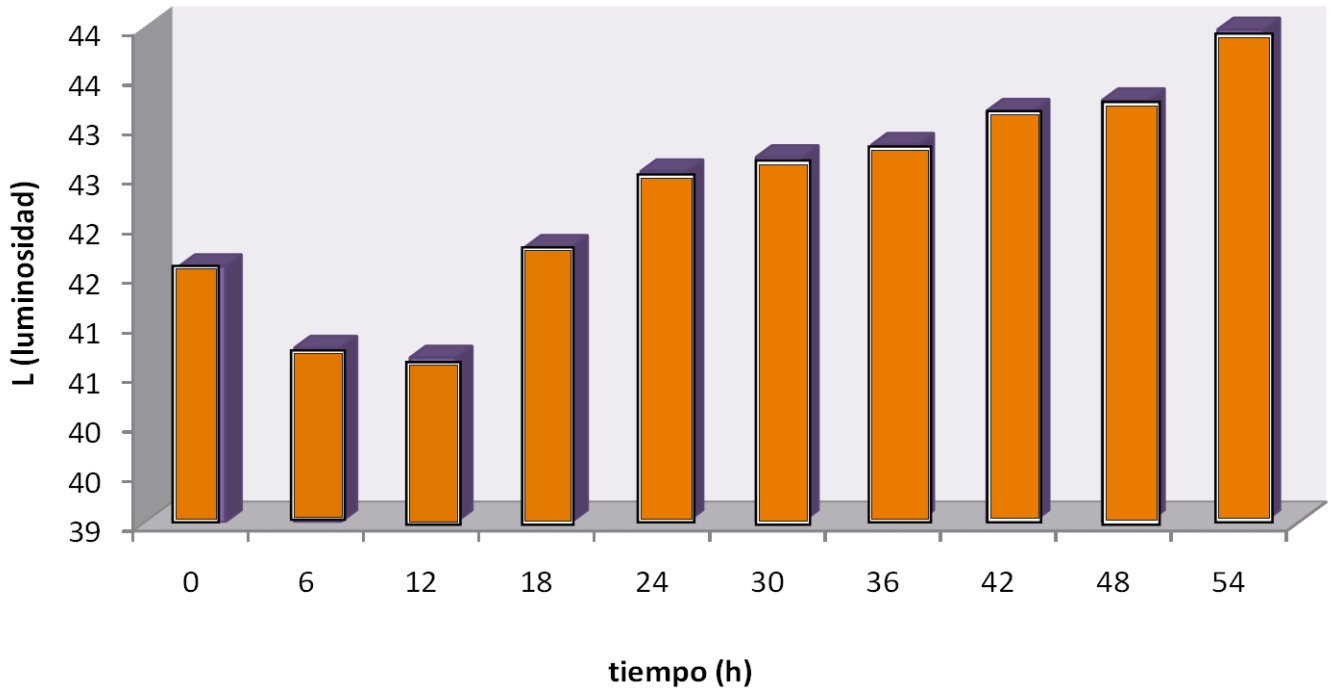


Figura 80. Variación de la luminosidad del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.

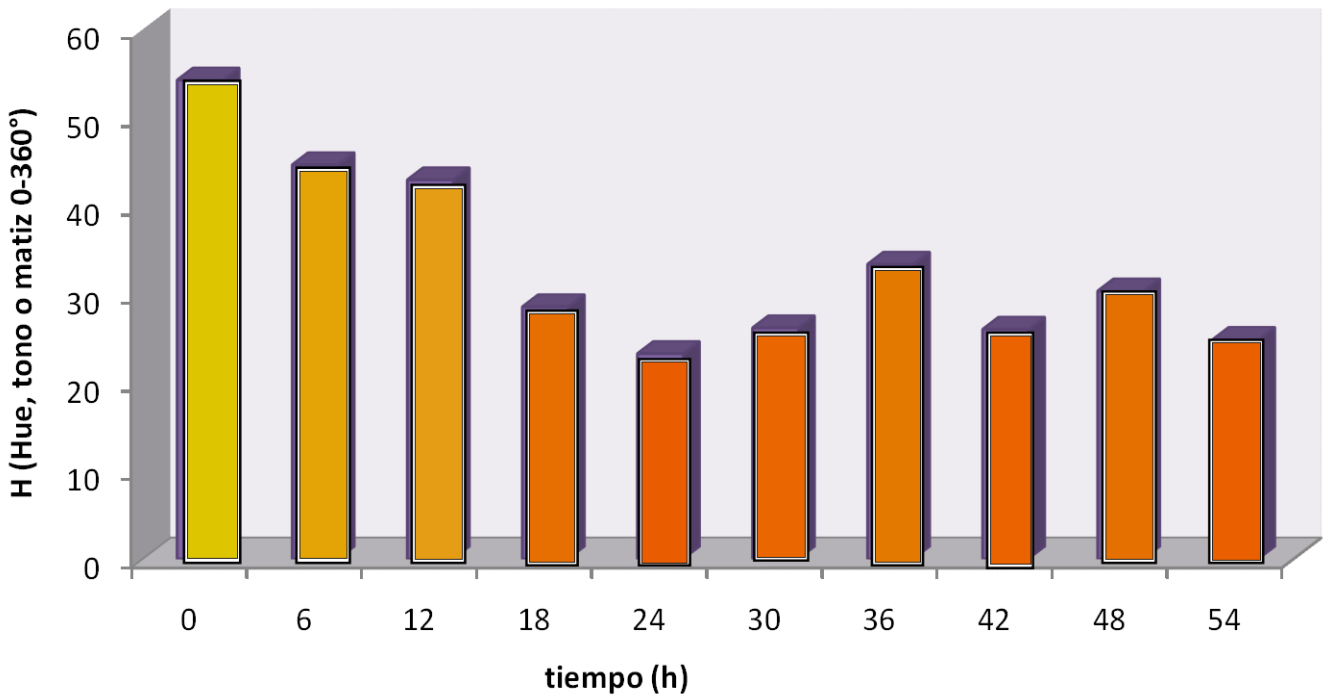


Figura 81. Variación del tono o matiz del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.

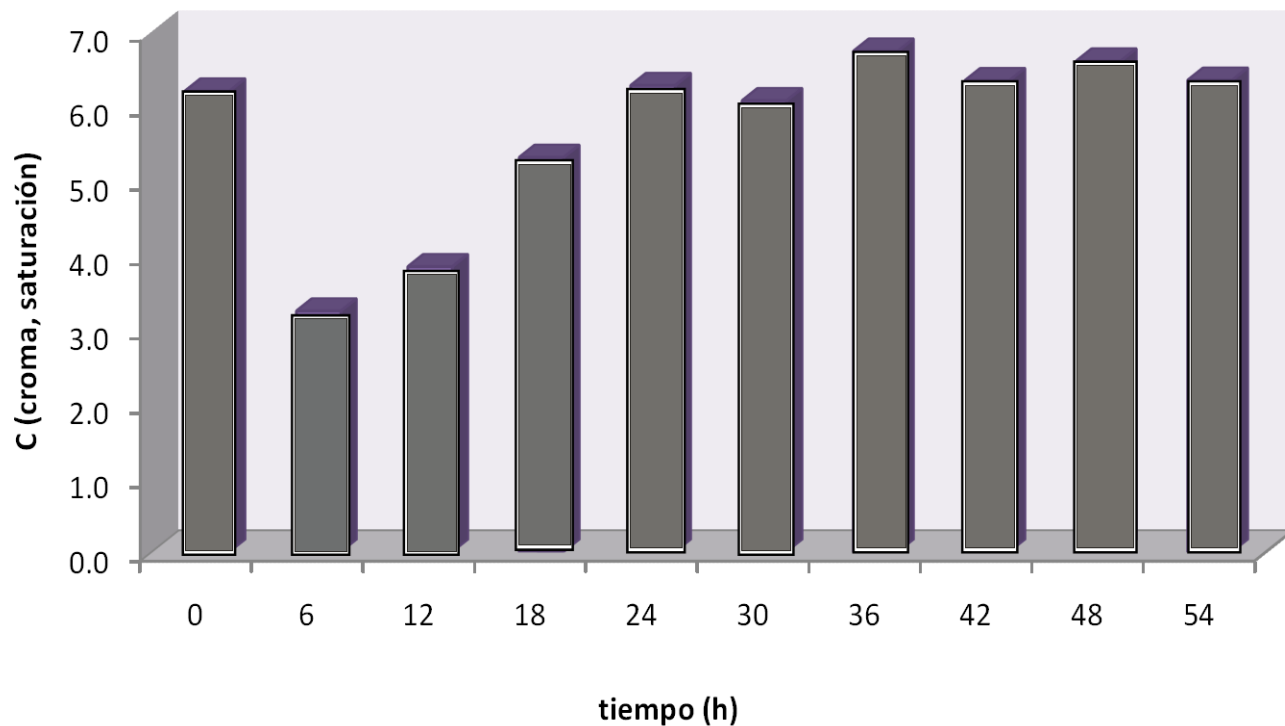


Figura 82. Variación del croma o saturación del fermentado de maíz azul a diferentes tiempos de fermentación.

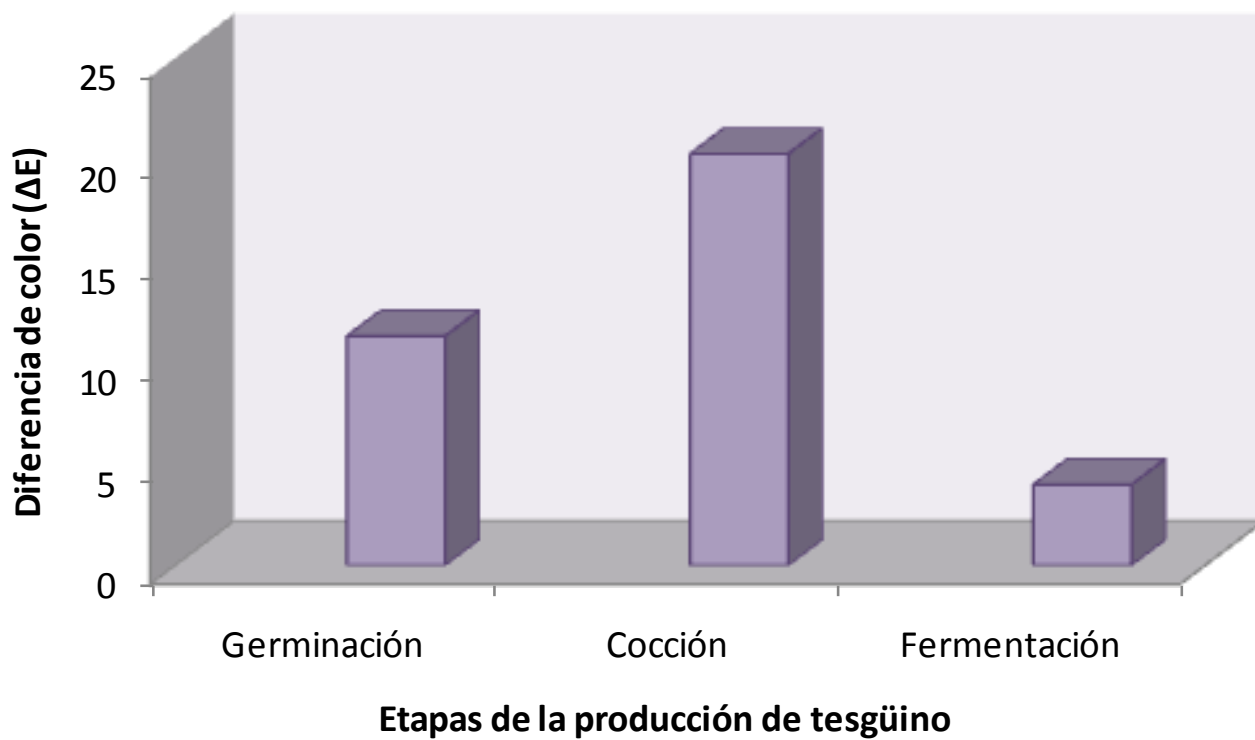


Figura 83. Diferencias de color evaluadas en las diferentes etapas de elaboración de teagüino.

9.10. Cinéticas de crecimiento microbiano para la etapa de fermentación del proceso de elaboración de tesgüino.

Los cereales son uno de los sustratos más adecuados para el desarrollo de alimentos que contienen microorganismos probióticos (en la mayoría de los casos bacterias ácido lácticas o bifidobacterias) y pueden tener también propiedades prebióticas. Las principales propiedades bioquímicas que afectan la funcionalidad y calidad de la formulación de un probiótico son: la biomasa, la concentración de ácido láctico y el pH, al cantidad de microorganismos es un indicador de la funcionalidad, el ácido láctico influye en las características sensoriales y actúa como agente conservador mientras que el pH es el principal factor determinante de la estabilidad y seguridad del producto durante el almacenamiento.

Se elaboraron las cinéticas de crecimiento para cada uno de los dos microorganismos empleados: L. plantarum y S. cerevisiae. Con fines de comparación se usó la forma integrada del modelo logístico (Zwietering, 1990; Loeza y col. 2007)

$$X(t) = \frac{X_{max}}{\left[1 + \left[\frac{(X_{max} - X_0)}{X_0} \right] \cdot e^{(-\mu_{max} \cdot t)} \right]}$$

Donde:

X= concentración de biomasa al tiempo t

t= tiempo de fermentación

μ_{max} = velocidad máxima de crecimiento específico

X_{max} = concentración máxima de biomasa

X_0 = concentración de biomasa

En la Figura 84 se muestra el crecimiento de L. plantarum en medio MRS, en el cual fue conservada la cepa, como puede observarse, los datos experimentales se ajustan en buena medida al crecimiento predicho por el modelo, mientras que en la Figura 85 se muestra el crecimiento del lactobacilo en maíz previamente procesado para la elaboración de tesgüino, éste es un medio natural rico en nutrientes, se observa un crecimiento por arriba del esperado de acuerdo al modelo. En la Figura 86, se muestra el mismo microorganismo en maíz procesado, pero con alimentación a las 24 h tal como lo marca el proceso de elaboración de tesgüino, en este caso, se puede ver una inflexión en el crecimiento obtenido y por tanto un desajuste con respecto al modelo, además el crecimiento es ligeramente menor.

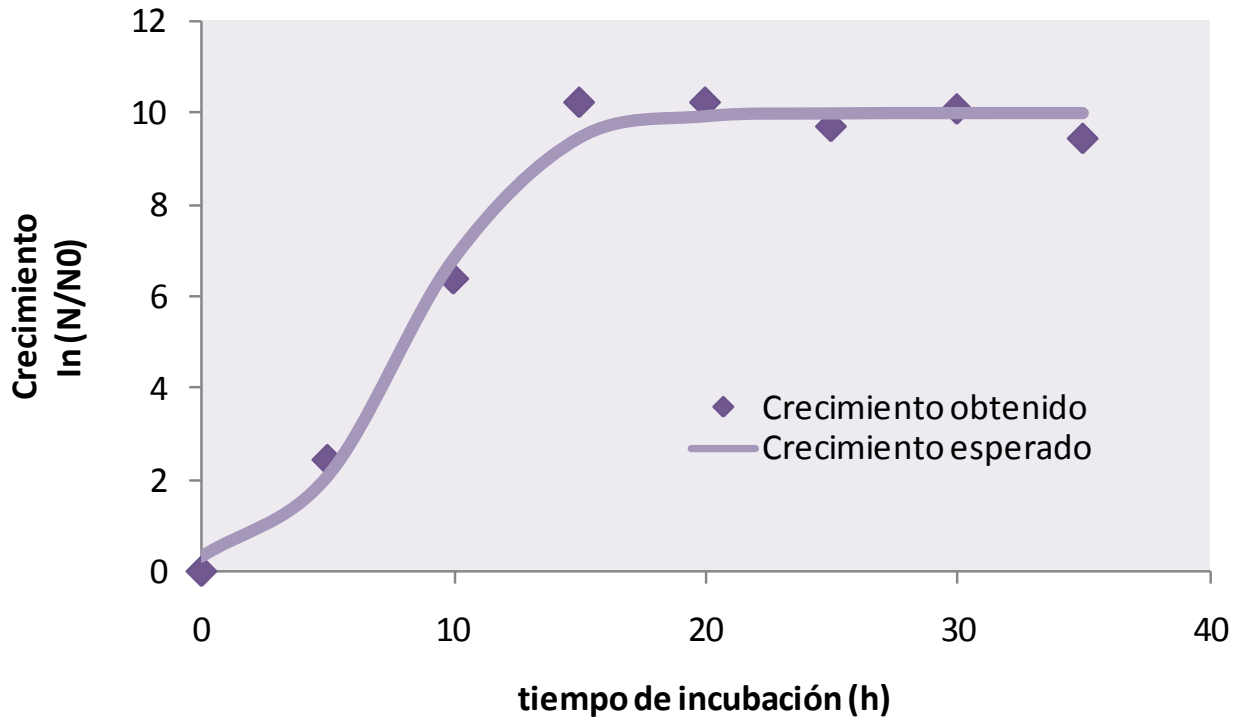


Figura 84. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* en medio líquido MRS a 36 °C.

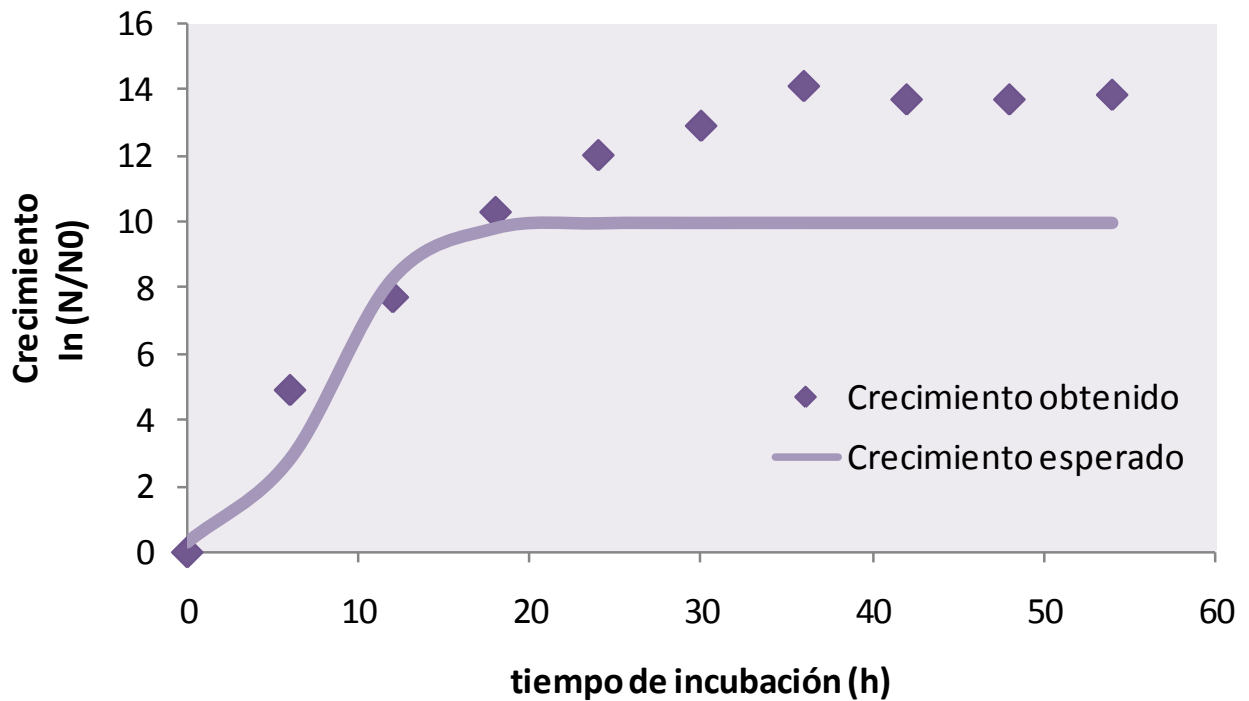


Figura 85. Cinética de crecimiento (36 °C) de *L. plantarum* en maíz germinado, molido y cocinado.

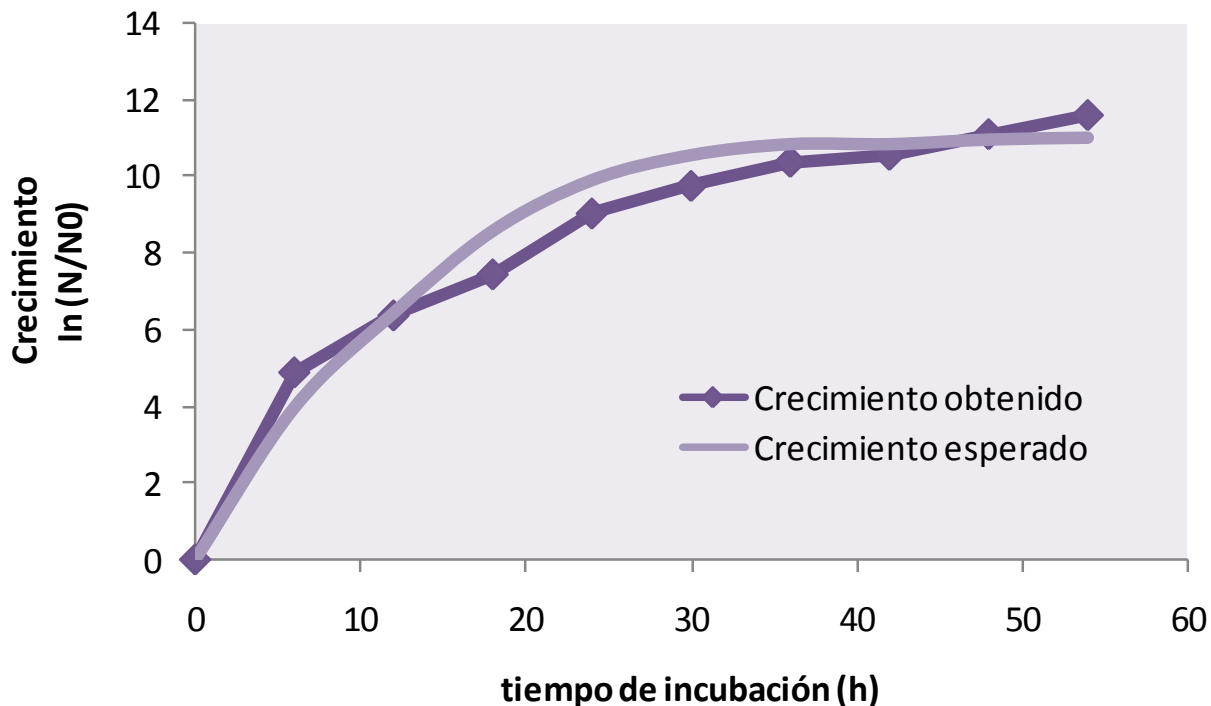


Figura 86. Cinética de crecimiento (36 °C) de *L. plantarum* en maíz germinado, molido y cocinado con alimentación de sustrato (maíz germinado 24h más, molido y cocinado).

En la Figura 87, se muestra el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio YM, al igual que en el caso anterior, cuando se usa el medio controlado, el crecimiento se ajusta al modelo y como se observa en la Figura 88, en un medio rico, el crecimiento es mayor al esperado. Sin embargo, en el caso de la fermentación con alimentación a las 24h, al contrario que con el microorganismo anterior, el crecimiento es mayor que el predicho.

En el caso de las Figuras 90 y 91, se muestra el crecimiento obtenido al fermentar el atole de maíz cocinado con ambos microorganismos y con alimentación a las 24h, se observa en ambos casos el punto de inflexión de la alimentación de forma más pronunciada, además, el crecimiento de *L. plantarum* es similar al obtenido en MRS, mientras que *S. cerevisiae* crece de forma más abundante, esto puede ser debido a que *L. plantarum* permite el crecimiento de levaduras pues las bacteriocinas producidas por este no tienen efecto sobre las primeras. Además, baja el pH (Figura 92) del medio lo que permite un mejor desarrollo de *S. cerevisiae*. En cuanto a la producción de metabolitos, se

midieron los dos principales productos de la fermentación, el etanol y el ácido láctico, los resultados se muestran en las Figuras 93 y 94.

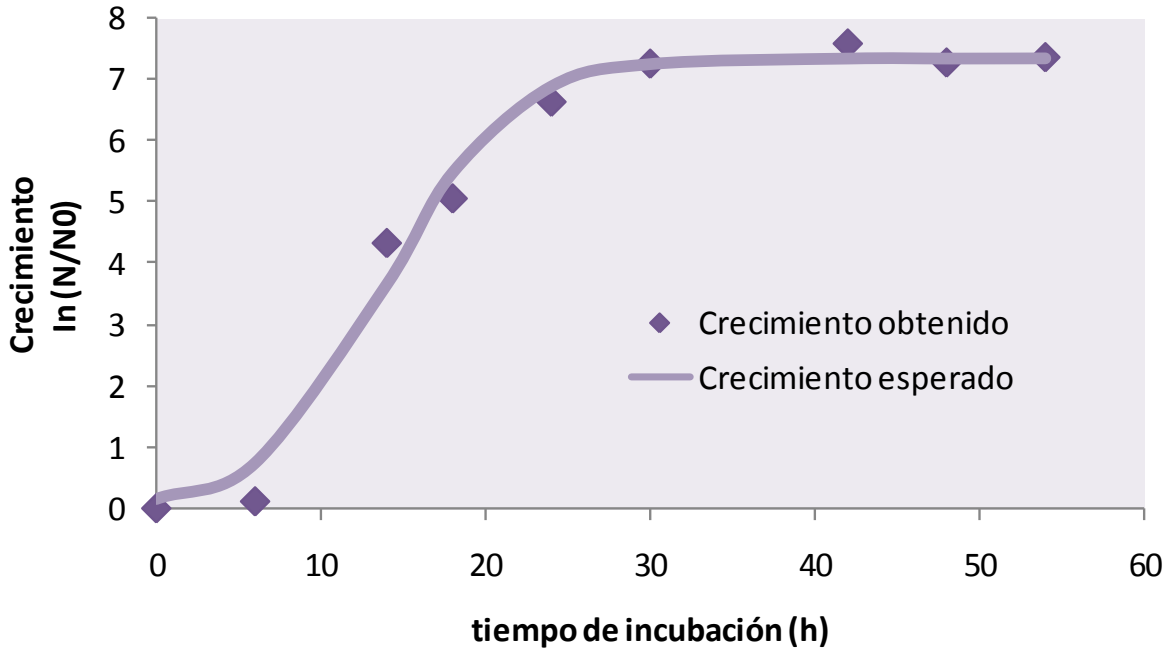


Figura 87. Cinética de crecimiento de S. cerevisiae en medio líquido MY a 32 °C.

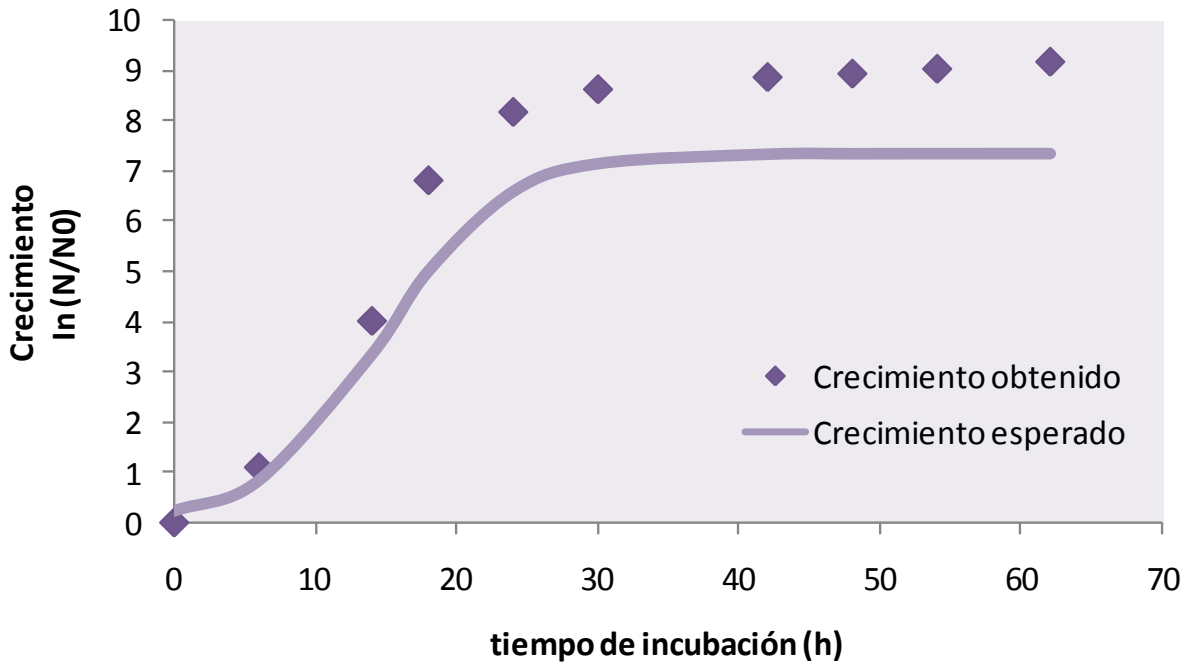


Figura 88. Cinética de crecimiento de S. cerevisiae (32 °C) en maíz germinado, molido y cocinado.

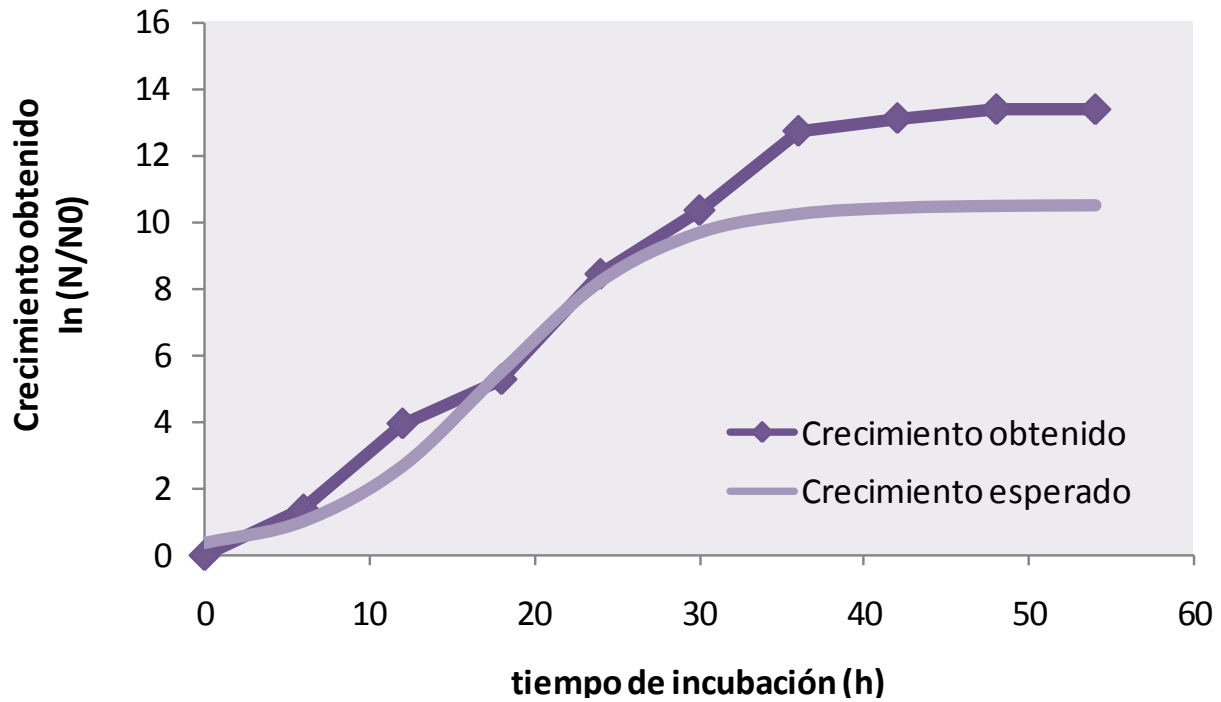


Figura 89. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* (32°C) en maíz germinado, molido y cocinado con alimentación de sustrato (maíz germinado 24h más, molido y cocinado).

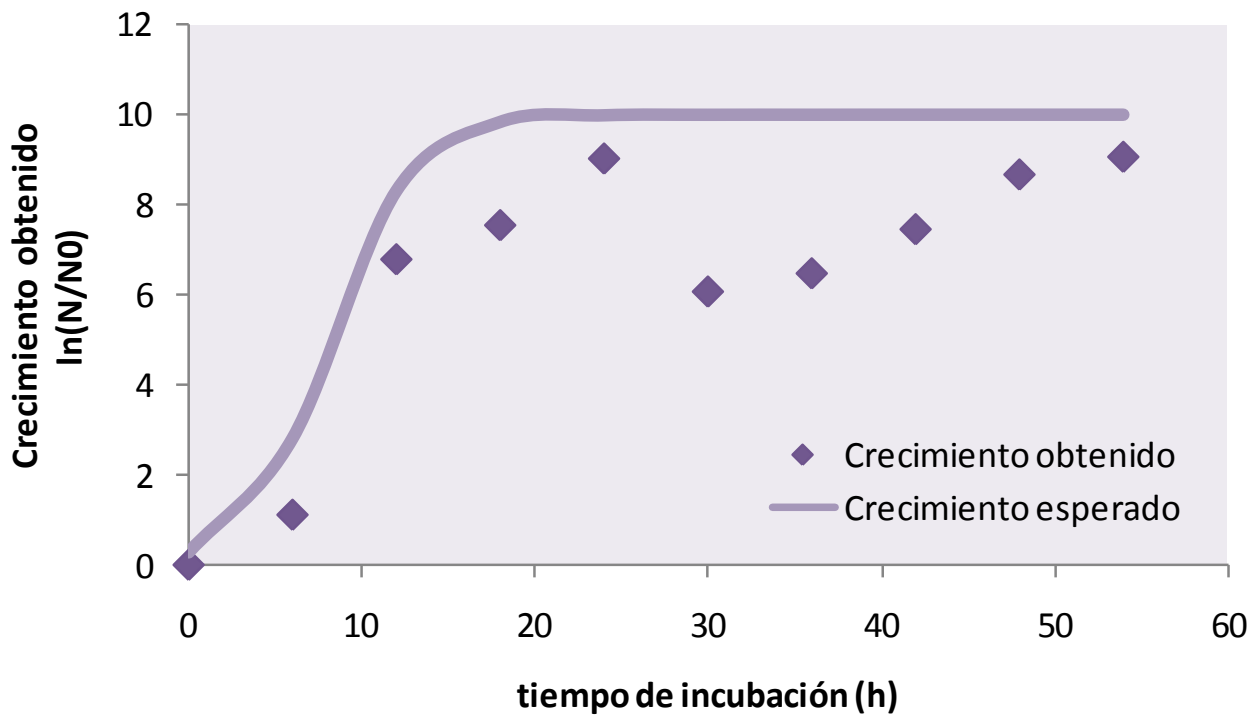


Figura 90. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* durante la fermentación del tesgüino.

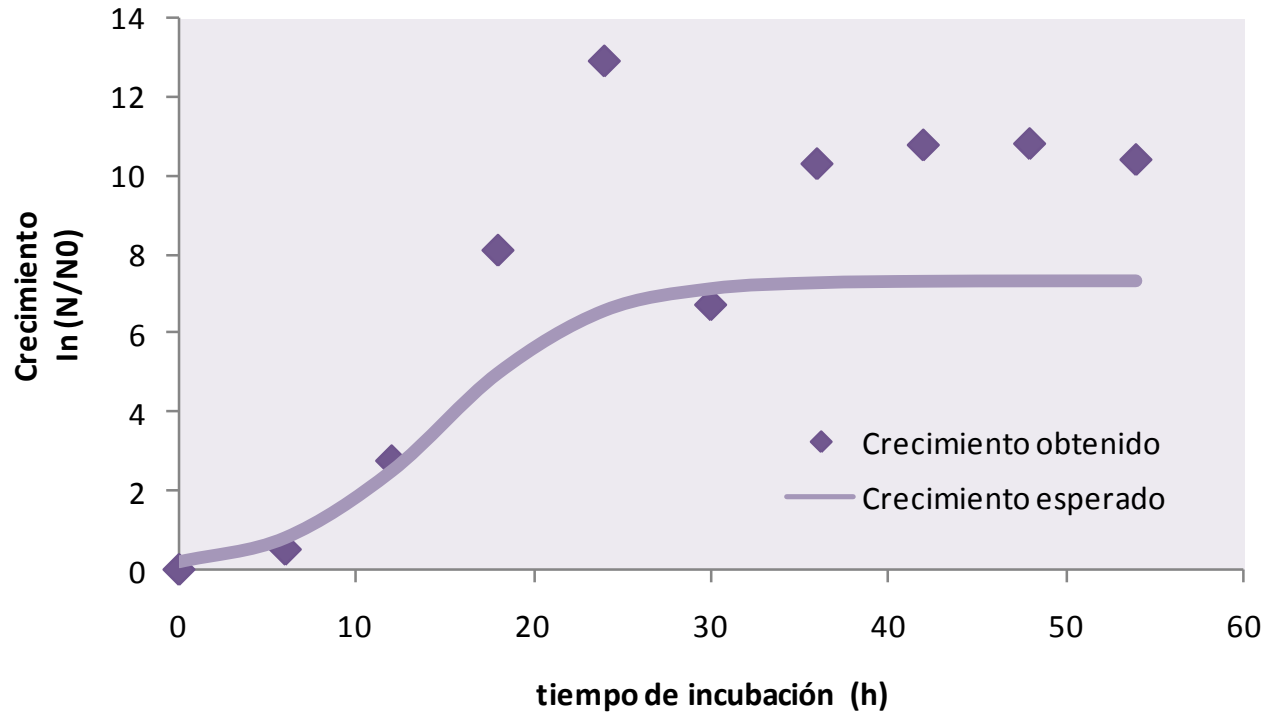


Figura 91. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación del tesgüino.

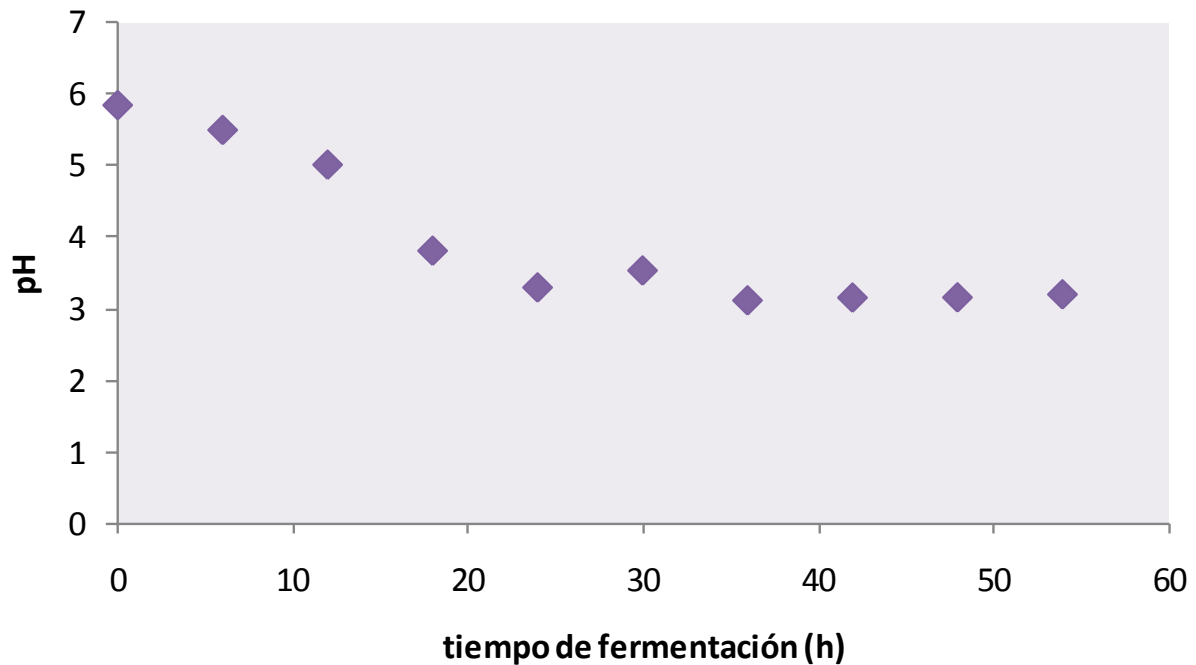


Figura 92. Variación del pH del medio con respecto al tiempo de fermentación de tesgüino de maíz azul.

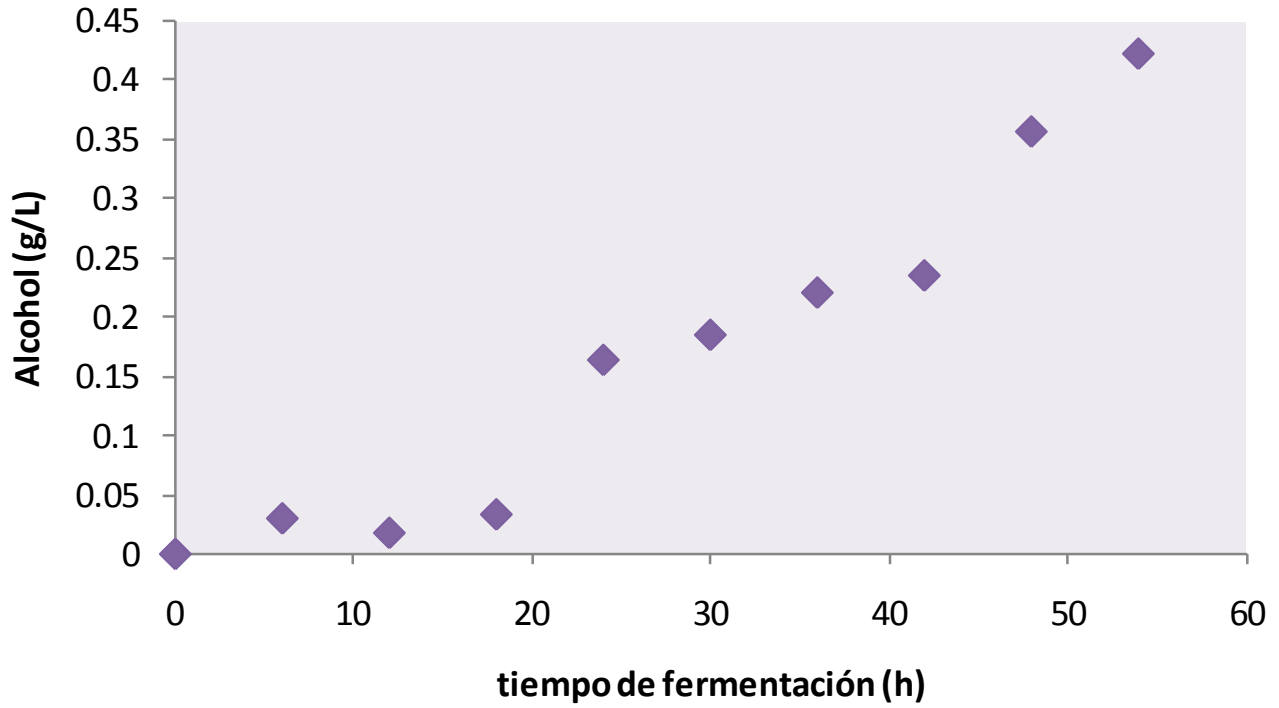


Figura 93. Cantidad de etanol producido durante la fermentación de tescüino de maíz azul.

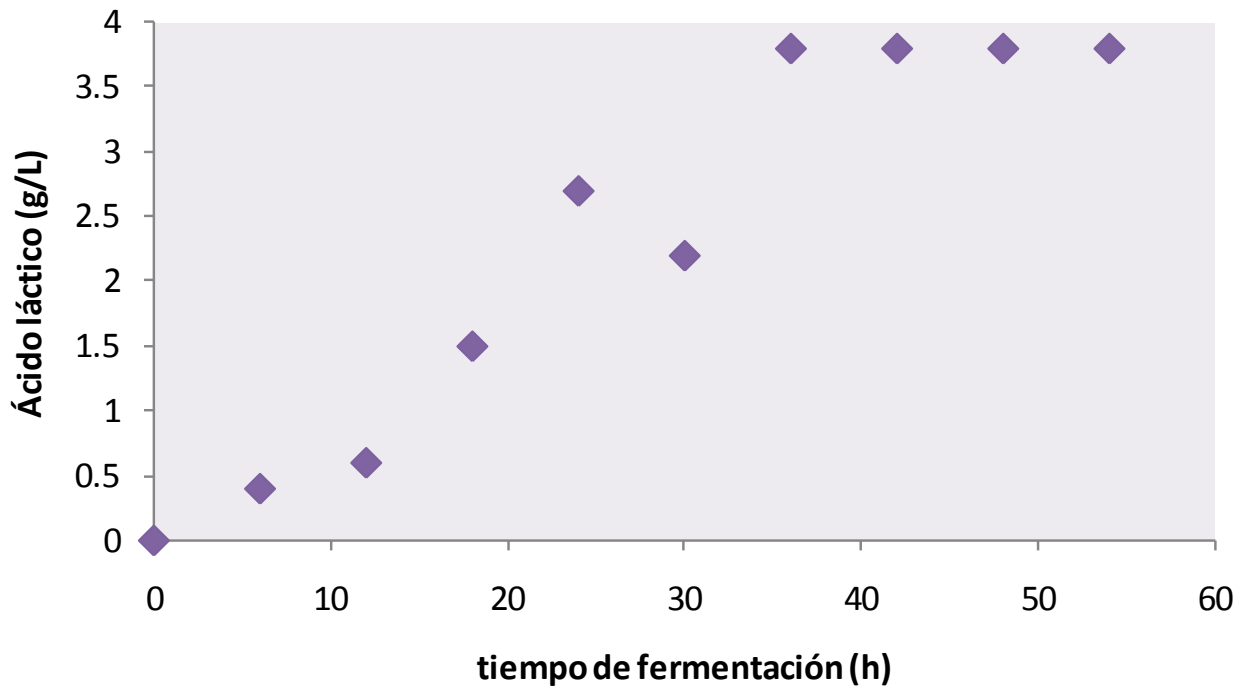


Figura 94. Variación de la cantidad de ácido láctico durante la fermentación de tescüino de maíz azul.

9.11.Producto terminado.

Se elaboró una muestra de producto bajo las condiciones mostradas en la Figura 42. Se germinaron 250 g de granos de maíz de donde se obtuvieron 450 g de germinado, dicha cantidad se dividió en dos partes iguales, una mitad se germinó durante 24 h más, mientras que la otra se molió y suspendió en agua para cocinarse a 95 °C durante 8h, el atole obtenido, de color café, se coló y el líquido obtenido se llevó a un volumen de 500 mL que se usaron como sustrato de la fermentación.

En la Tabla 21, se muestran los valores y apreciaciones de algunas características fisicoquímicas y sensoriales del producto terminado. Mientras que en el atole cocido, se tuvo un pH de 5.85 y un color café, en el producto fermentado, se observó un cambio de coloración a rojizo, lo cual corresponde al color de las antocianinas en el valor final de pH que fue de 3.19. Los resultados de pH son cercanos a los encontrados por Lappe y col. (1989) quienes determinaron que el pH final del tesgüino fue de 3.0, del mismo modo, la cantidad de ácido láctico reportada por dichos autores es de 0.33% lo cual corresponde a un valor muy cercano al observado en este trabajo, durante la fermentación se observó un aumento rápido de acidez que fue desde una inicial de 0.01% hasta 0.38 % expresada como ácido láctico.

En cuanto a las características sensoriales, se obtuvo un producto ácido, con sabor ligeramente alcohólico, de color rojizo y ligeramente viscoso que al ser degustado con azúcar fue agradable y refrescante, las características son comparables a las del tejuino consumido por la población mestiza (color café claro, espeso en algunas ocasiones y ligero en otras, dulce por la adición de piloncillo y de acidez muy ligera sin contenido alcohólico) .

Tabla 21. Características fisicoquímicas y sensoriales del Tesgüino de 56h de fermentación.

Característica	Observación
pH	3.19
Acidez titulable expresada como % de ácido láctico	0.38
% de alcohol	1.6
Color	Rojizo
Aroma	Ligeramente alcohólico
Sabor	Ácido
Textura	Líquida, ligeramente viscosa

10. CONCLUSIONES

- Las características físicas y fisicoquímicas del maíz azul usado en este estudio, son comparables a las de materias primas similares reportadas en la bibliografía.
- La cantidad de antocianinas y compuestos fenólicos totales del maíz nativo son 53.94 mg cianidina 3-glucósido y 152.77 mg ác. Ferúlico/100 g respectivamente.
- Las condiciones de germinación más adecuadas para el maíz usado para la elaboración de tesgüino en este estudio son: 24 h de remojo del grano, 200g de agua por cada 100g de grano, temperatura de 25 °C y 96h de totales de germinación.
- Bajo las condiciones de experimentación llevadas a cabo en este trabajo, las magnitudes de humedad, área y diámetro de Feret aumentan conforme avanza el tiempo de germinación presentando las mismas tendencias.
- La dimensión fractal del área del grano con respecto al tiempo, presenta un comportamiento caracterizado por la aparición de tres picos, el primero correspondiente a la absorción rápida de agua y el tercero al surgimiento de la radícula momento en el cuál, la germinación del grano es percibida visualmente, en tanto, el segundo pico, de forma tentativa, corresponde al comienzo de la formación de la radícula en el interior del grano.
- Dados los enunciados anteriores, se propone que, el grano de maíz azul estudiado, ha germinado cuando su dimensión fractal tiene un máximo entre las 72 y 76 horas del proceso.
- La cantidad de compuestos fenólicos aumenta durante la etapa de germinación, disminuye considerablemente en la etapa de cocción y aumenta durante la fermentación para dar como resultado un incremento global de 101%.
- La cantidad de antocianinas aumenta ligeramente durante la germinación del maíz y disminuye drásticamente durante la etapa de cocción para mantenerse constante durante la fermentación, la pérdida total de estos pigmentos durante el proceso es de 43%.
- La actividad de secuestro de radicales libres está relacionada directamente a la cantidad de compuestos fenólicos totales, en forma global, se obtuvo una pérdida de 20% con respecto al maíz sin procesar.

- Es posible registrar instrumentalmente los cambios en color durante el proceso de elaboración del tesgüino de maíz azul aunque estos no coinciden necesariamente con la percepción sensorial humana.
- Fue posible ajustar al modelo logístico en crecimiento de L. plantarum y S. cerevisiae en medios MRS y YM respectivamente, sin embargo el crecimiento en medio rico (maíz procesado) no se ajustó a dicho modelo.
- Ambos microorganismos crecieron de forma simultánea en el mosto de fermentación, habiendo producido cantidades representativas de etanol y ácido láctico.
- Las características sensoriales del tesgüino elaborado en el laboratorio, son similares a las del tejuino producido y comercializado por la población mestiza de algunas zonas de México.
- El tesgüino producido en el laboratorio, al ser elaborado con maíz azul, puede aportar beneficios adicionales a la adquisición de nutrientes esenciales (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales), protegiendo al cuerpo humano del daño oxidativo producido por los factores ambientales de estrés.

11. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (1983). Approved methods. St. Paul M.N.: American Association of Cereal Chemists .II:32
- Abdel-Aal, E., Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. Cereal Chem. 76: 350-354.
- Abdel-Aal, E., Hucl, P. (2003). Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. J. Agric. Food Chem. 51:2174-2180.
- Abuja, P., Murkovic, M., Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. J. Agric. Food Chem. 40:4091-4096.
- Addison, P. (2001) Fractals and chaos. Publicado por: The Institute of physics of London. Inglaterra. Pp. 1-53
- Adom, K., Liu, R. (2002). Antioxidant Activity of Grains. J. of Agric. and Food Chem. 50(21):6182-6187.
- Aguilera J., Stanley, W. (1999) Microstructural principles of food processing and engineering. Ed. Aspen. 2ª Ed. E.U.A. pp.71-87
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F. (2005). Comparison of Antioxidant Activity, Anthocyanins, Carotenoids, and Phenolics of Three Native Fresh and Sun-Dried Date (*Phoenix dactylifera L.*) Varieties Grown in Oman. J. Agric. Food Chem. 53:7592-7599.
- Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F. (2000) Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. J. Agric. Food Chem. 48: 2755-2759.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 127:183-198.
- Ashenafi, M. and Busse, M. (1989) Inhibitory effect of Lactobacillus plantarum on Salmonella infantis, Enterobacter aerogenes and Escherichia coli during tempeh fermentation. J. Food Protect. 52: 169-172.
- Badui, D. (1993). Química de los alimentos. México.: Addison Wesley Longman. 379:403
- Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., Atalay, M. (2003) Review: anti-angiogenic, antioxidant and anticarcinogenic properties of novel anthocyanin-rich berry extract formula. En

16:28

- Bailey, G., Williams, D. **(1993)**. Potential mechanisms for food related carcinogens and anticarcinogens. Food Technology. 47:105-118.
- Bandoniene, D., Murkovic, M. **(2002)** On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (Malus domestica L.). J. Agric. Food chem. 50:2482-2487.
- Bao, J., Cai Y., Sun, M., Wang, G., Corke, H. **(2005)** Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese Bayberry (Myrica rubra) extracts and their color properties and stability. J. Agric. Food Chem. 53: 2327-2332.
- Baraud, J., Genevois, L., Panart, J. **(1974)**. Anthocyanins of corn. J. Agric. Trop. Bot. Appl. 11:55-59.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. Yeasts: characteristics and identification. (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Barros, C., Buenrostro, M. **(1997)**. El Maíz. Arqueología Mexicana. 25:8-11.
- Benz, F. **(1997)**. El Maíz. . Arqueología Mexicana. 25:16-23.
- Bergey's. **(1992)** Manual of Determinative Bacteriology Tenth Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J.P. **(2006)** Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol. Rev. 30:487-513
- Bioxon. (s.f.). Manual de medios de cultivo. 16.
- Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I. **(2004)** Sour Cherry (Prunus cerasus L) anthocyanins as ingredients for functional foods. J. of biomed. and biotech. 5:253-258.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczynska, S., Rietjens, I., Tyrakowska, B. **(2005)** Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. J. Agric. Food Chem. 53:5526-5534.
- Bors, W., Werner, H., Michel, C., Saran, M. **(1987)**. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. Methods Enzymol. 186: 343-355.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. **(1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28:25-30.
- Braun, E. **(2003)** *Caos, Fractales y cosas raras*. Ed. Fondo de cultura económica. México. Pp. 7-42
- Braña, J. **(2003)** Resumen del curso: Introducción a la geometría fractal. www.fractaltec.org
11-abril-05 12:00 am
- Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J. **(1978)**. Chemistry of anthocyanin pigments 3. Relaxation amplitudes in pH jump experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 100:6202.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. **(2004)**. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences.* 74:2157-2184.
- Cai, Y. Z., Xing, J., Sun, M., Zhan, Z., Corke, H. **(2005)** Phenolic antioxidants (hydrolysable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from Rosa chinensis Flowers. *J. Agric food chem.* 53:9940-9948.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. **(1996)**. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Chem.* 44:3426-3431.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. **(1999)**. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microb.* , 50:131-149.
- Cevallos, C., Cisneros, Z. **(2003)**. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweetpotato. *J. Agric. Food Chem.* 51:3313-3319.
- Chaillou, L., Nazareno, M. A. **(2006)** New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54:8397-8402.
- Chanona, P. **(2004)** Estudio morfométrico fractal de materiales sometidos a deshidratación y su aplicación en la descripción del secado convectivo de placas y esferas. Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N.
- Clydesdale, F., Francis, F. **(1976)**. Pigments. En C. F. J, "Principles of Food Chemistry, Part I, Food Chemistry". New York: Marcel Dekker.
- Cook, N., Samman, S. **(1996)**. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.* 7:66-76.
- Cornejo, M. **(2003)**. Estudio del proceso de obtención de tortilla en las antocianinas del maíz azul. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. 35-40

- Cruz, U., Ulloa, M. **(1973)**. Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países Latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. XXXIV:423-457.
- Da Porto C., Calligaris S., Celotti E., Nicoli M. **(2000)** Antiradical properties of comercial cognacs assessed by the DPPH test. *J. Agric. Food Chem.* 48:4241-4245.
- De Beer D., Joubert E., Marais J., Manley M. **(2006)** Unravelling the total antioxidant capacity of pinotage wines: contribution of phenolic compounds. *J. Agric Food Chem.* 54:2897-2905.
- Delgado, V., Jiménez, A., Paredes, L. **(2000)**. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40:173–289.
- Del Pozo I. D., Brenes C. H., Serna S. O., Talcott S. T. **(2006)** Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research Int.* 39:696-703.
- Deosthale **(2003)**. The nutritive value of foods and the significance of some household processes. Recuperado en Marzo de 2007, de <http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/80478e/80478E0j.htm>
- De Rosa, T. **(1997)**. *Tecnología de los vinos blancos*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- De Vuyst, L. **(1994)**. Bacteriocins and bacteriocin-like substances from *Lactobacillus*, pp. 319-329. In: L. de Vuyst and E. J. Vandamme (1a ed.). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London.
- Dewanto V., Wu X., Hai R. **(2002)** Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. agric. Food Chem.* 50:4959-4964.
- Dziedzic, S., Hudson, B. **(1983)** Hydroxy isoflavones as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 11:161-166
- Dykes L., Rooney L., Waniska R., Rooney, L. **(2005)** Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes, *J. Agric. Food Chem.* 53:6813-6818
- Dujon, B. **(1996)**. The yeast project: what did we learn. *Trends. Genet.* 7: 263-270.
- Dröge, W. **(2002)**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* 82:47-95.
- Espín J., Soler R., Wichers H., García C. **(2000)** Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48:1588-1592.

- Emmons, C., Peterson, D., Paul, G. **(1999)**. Antioxidant capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4894-4898.
- Eneje, L., Ogu, E., Aloh, C., Odibo, F., Agu, R., Palmer, G. **(2004)**. Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow maize varieties. *Process Biochem.* 39:1013-1016.
- Escribano, B., Santos, B., Rivas, G. **(2004)**. Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr. A* 1054:129-141.
- Euzéby, J.P. **(2009)** List of prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Lactobacillus*. En <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html> 15-mayo-2009 13:44
- Fang, Y., Yang, S., Wu, G. **(2002)**. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18:872–879.
- FAO. **(1993)**. El maíz en la alimentación humana. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Colección FAO: Alimentación y nutrición. 25.
- Fossen, T., Sliemstad, R., Anderden, M. **(2001)**. Anthocyanins from Maize (*Zea mays*) and Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* 49:2318-2321.
- Fukumoto, L., Mazza, G. **(2000)**. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48:3597-3604.
- García, G., López-Mungía, C. **(2005)**. Bebidas alcoholicas no destiladas. En *Biotecnología Alimentaria*. Compiladores García, G.M., Quintero, R.R., López, M.A. México: Limusa. 263-311.
- García, V., Zafrilla, P., Tomás, B. **(1998)**. Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperatura. *J. of Food Science.* 64(2):243-247.
- González, A. **(1995)** El Maíz y su conservación. México .Ed. Trillas. 1ª Ed.: 53-131
- Gould, K. **(2004)**. Nature's Swiss Army Knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. biomed. and biotech.* 5:314-320.
- Haard, N., Odunfa, S., Lee, C., Quintero, R., Lorence, Q., Wachter, R. **(1999)**. Fermented cereals. A global perspective. Food and Agric. Organization of the United Nations. *Agricultural Services Bulletin.* 138:99-114.

- Halbwirth, H., Martens, S., Wienand, U., Forkmann, G., Stich, K. **(2003)**. Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science*. 164:489-495.
- Hagerman, A., Rice, M., Ritchard, T. **(1998)** Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* 46:2590-2595
- Harborne, J., Williams, C. **(2000)**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 52:481-504.
- Haslam, E. **(1996)**. Natural polyphenols (Vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59:205-215 .
- Henriquez, C., Lissi, E. **(2002)** Evaluation of the extinction coefficient of the ABTS derived radical cation. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 47:4
- Henriquez, C., Aliaga, C., Lissi, E. **(2004)** Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols. *J. Chil. Chem. Soc.* 49:1
- Hoch, W., Zeldin, E., McCown, B. **(2001)**. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree physiology*. 21:1-8.
- Holzapfel, W. H; Geisen, R. and Schillinger, U. **(1995)** Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-362.
- Huang, D., Ou, B., Prior, L. **(2005)** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-1856
- Hu, S., Liang, Z., Chia, Y., Lien, J., Chen, K., Lee, M., Wang, J. **(2006)** Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *J. Agric. Food Chem.* 54:2103-2110
- Hukkanen, A., Polonen, S., Karenlampi, S., Kokko, H. **(2006)** Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *J. Agric. Food Chem.* 54:112-119
- Jackman, R., Smith, J. **(1992)**. Anthocyanins and betalains. En G. H. Hendry, *Natural Food colorants*. 2^ª Ed. Escocia: Editorial Blackie and Son. 248-249.
- Kähkönen, M., Heinonen, M. **(2003)**. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *J. Agric. Food Chem.* 51:628-633.

- Kang, H., Saltveit, M. **(2002)**. Antioxidant Enzymes and DPPH-Radical Scavenging Activity in Chilled and Heat-Shocked Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings Radicles. *J. Agric. Food Chem.* 50:513-518.
- Kandler, O. **(1983)** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 49: 209-224.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K. **(2004)**. Screening for Antioxidant Activity in Edible Plant Products: Comparison of Low-Density Lipoprotein Oxidation Assay, DPPH Radical Scavenging Assay, and Folin-Ciocalteu Assay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2391-2396.
- Kim, D., Won-Lee, K., Joo-Lee, H., Yong-Lee, C. **(2002)** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50:3713-3717
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. **(1996)** Composición y análisis de alimentos de Pearson. Editorial CECSA. 2ª Edición. México. Pp. 311-314
- Klaenhammer, T. R. **(1988)** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337.
- Kuskoski, E., Asuero, A., García-Parilla, C., Troncoso, A., Fett, R. **(2004)** Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(4): 691-693
- Latté, K., Kolodziej, H. **(2004)** Antioxidant properties of phenolic compounds from Pelargonium reniforme. *J. Agric. Food Chem.* 52:4899-4902
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., Kanner, J. **(1999)**. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47:67-70.
- Lappe, P., Ulloa, M. **(1989)**. Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara. México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lee-Won, K., Kim-Jun, Y., Lee-Joo, H., Lee-Yong, C. **(2003)** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Agric. Food Chem.* 51:7292-7295
- Larson, R. **(1998)**. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27(4):969-978.
- Lohachoompol, V., Srzednicki, G., Craske, J. **(2004)** The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J. Biomed. Biotechnol.* 5:248-252

- López, I. **(2004)**. Programa fundamental para el desarrollo Económico del Estado de México hacia el 2005 y visión de competitividad al 2020. ITESM.
- Lotito, S., Frei, B. **(2004)**. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free radical biology and medicine*. 36(2):201-211.
- Lyons, P. **(1997)** Opinión de los hombres de negocios. *Avicultura Profesional*. Vol. 15. No. 7.
- Manresa, A.G., Vicente, I. **(2007)** El color en la industria de los alimentos. Cuba. Ed. Universitaria: 4-41
- Marco, G. J. **(1968)** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45:594-598.
- Marco, J. **(2006)**. Química de los productos naturales. Madrid, España: Ed. Síntesis.
- Marcocci, L., Packer, L., Sekaki, A. **(1994)**. Antioxidant action of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Methods in enzymology*. 234:462-475.
- Martínez, F., González, G., Culebras, J., Tuñón, M. **(2002)**. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17(6):271-278.
- Mesas, J., Alegre, M. **(1999)** El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2(4):174-183
- Melgosa, M., Pérez, M., Yebra, R., Huertas, R., Hita, E. **(2001)** Algunas reflexiones y recientes recomendaciones internacionales sobre evaluación de diferencias de color. *Óptica pura y aplicada*. 34:1-10
- Mc Donald, L. C; Fleming, H. P. and Hassan, H. M. **(1990)** Acid tolerance of Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus plantarum. *Appl. Environm. Microbiol.* 56: 2120-2124.
- Miller, N., Rice-Evans, C. **(1997)**. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60:331-337.
- Miller, N., Rice, E., Davies, M., Gopinathan, V., Milner, A. **(1993)**. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84:407-412.

- Mohd, I., Bressani, R., Elias, L. **(1980)**. Changes in Chemical and Selected Biochemical Components. Protein Quality and Digestibility of Mung Bean (*Vigna radiate*) during Germination and Cooking. *Plant Foods in Human Nutrition*. 30: 135-144.
- Moreno, L. **(2004)** Los colores tienen unas propiedades inherentes que les permite distinguirse de otros y acuñar distintas definiciones de tipo de color. En: <http://www.desarrolloweb.com/articulos/1503.php> 9-abril-09 15:07
- Moreno, C. **(1996)**. Vida y obra de granos y semillas. México, D.F. Fondo de Cultura Económica.IV.
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/vidayob.htm>
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., Wrolstad, R. **(2002)**. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. *J. Agric. Food Chem.* , 50:519-525.
- Mukai, T. and Arihara, K. **(1994)** Presence of intestinal lectin-binding glucoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1851-1854.
- Nakatani, N., Fukuda, H., & Fuwa, H. **(1979)**. Studies on naturally occurring pigments. Major anthocyanin of Bolivian purple corn (*Zea mays L.*) *Agric. Biol. Chem.* 43:389-391.
- Nava, A. **(2005)**. Estudio de la fermentación láctica en masas agrias utilizando diferentes harinas. *Tesis de Licenciatura*. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. I.P.N. 20-21.
- Nes, I. (1984) Plasmid profiles of ten strains of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 21: 359-361.
- Neurath, J. **(2006)**. La boda del maíz. *Artes de México. Rituales del maíz.* 78:41-51.
- Nielsen, I., Haren, G., Magnussen, E., Dragsted, L., Rasmussen, S. **(2003)** Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *J. Agric. Food Chem.* 51:5861-5866
- Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., Osawa, T. **(2001)** Antioxidative properties of phenolic antioxidants isolated from corn steep liquor. *J. Agric. Food Chem.* 49:177-182

- Nollet, L. **(1996)**. Handbook of Food Analysis. Volume I. En Handbook of Food Analysis. New York: Ed. Marcel Dekker. I:937.
- Olesupo, N., Olukoya, D., Odunfa, S. **(1995)** Studies on bacterocinogenic Lactobacillus isolates from selected Nigerian fermented foods. J. Basic. Microbiol. 35: 319-324.
- Paredes, L., Guevara, L., Bello, P. **(2006)**. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. México. Fondo de cultura económica. 212:68-92.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J., Wang, J., Yu, L. **(2006)** Chemical compositions, antioxidant capacities and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. J. Agric. Food Chem. 54: 3773-3778
- Pascual-Teresa, S., Rivas, G. **(2002)**. Analysis of Anthocyanins from purple corn cob. J. Sci. Food Agric. 82:1003-1006.
- Pedreshi, R., Cisneros, L. **(2006)** Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (Zea mays L.) J. Agric. Food Chem. 54:4557-4567
- Peleg, M. **(1993)** Fractals and Foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 33(2)149-165
- Peng, A. C. **(1975)** Effect of fermentation, processing and storage on lipid composition of sauerkraut. J. Sci. Food Agric. 26: 1325.
- Pérez, D., Leighton, F., Aspee, A., Aliaga, C., Lissi, E. **(2000)** A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. Biol. Res. 33:2
- Pérez, J., Saura, F. **(2006)** Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Research Int. 39: 791-800
- Peynaud, E. **(1989)** Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. 3ª ed. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Philpott, M., Gould, K., Lim, C., Ferguson, L. **(2004)** In situ and in vitro antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 52:1511-1513
- Piljac, J., Martínez, S., Valek, L., Stipcevic, T., Ganic, K. **(2005)** A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. Food Technol. Biotechnol. 43(3): 271-276

- Polachira, K., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. **(2004)** Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH[•] system. *J. Agric. Food Chem.* 52:912-915
- Poulson, H., Prieme, H., Loft, S. **(1998)**. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention.* 7(1):9-16.
- Pratt, D., Hudson, B. **(1990)** Natural antioxidants not exploited commercially. In *Food Antioxidants*: Hudson, B. Ed. Elsevier Applied Science: London, U.K., 1990; pp 171-191.
- Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C. **(1998)**. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. of Agric. and food Chem.* 46:2686–2693.
- Quesada, M., Cenis, J. **(1995)** Identificación de levaduras vínicas. Métodos basados en el estudio del ADN. *VitiVinicultura* 7-8:52-55.
- Randhir, R., Lin, Y., Shetty, K. **(2004)**. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.* 39:637-646.
- Re, R., Pellegrini, N., Protggente, A. **(1999)**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* , 26:1231-1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Papaganda, G. **(1996)**. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20:933-956.
- Robak, J., Gryglewski, R. **(1988)**. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37:837-841.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. **(1999)**. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66:401-436.
- Rosso, V., Ortíz, M., Sánchez, P., Duque, R., Arce, P. **(1998)**. Instructivo de laboratorio de bioquímica de alimentos de origen vegetal. México. Instituto Politécnico Nacional. 25-31.
- Salinas, M. M., Martinez, B., Soto, H. H., Paczka, O., Arellano, V. **(2003)**. Efecto de la Nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia.* 37:617-628.

- Salinas, M., Rubio, D., Díaz, V. **(2005)** Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (Zea mays). *Agrociencia*. 39(4):385-394.
- Sánchez-Moreno, C., Cao, G., Ou, B., Prior, R. **(2003)** Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 51:4889-4896
- Sanders, M. E. **(1994)** Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: Goldberg I (Ed). *Functional Food, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. London: Chapman and Hall: 294-322.
- Scampicchio, M., Wang, J., Blasco, A., Sánchez, A., Mannino, S., Escarpa, A. **(2006)** Nanoparticle-based assays of antioxidant activity. *Anal. Chem.* 78: 2060-2063
- Salmeron, I., Fuciños, P., Charalampopoulos, D., Pandiella, S. (2009) Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. *Food Chem.* Accepted manuscript 10.1016/j.foodchem.2009.03.112
- Samaniego, L.M., Sosa, M. **(2000)** Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y conservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, Cuba.
- Sarma, D., Sreelakshmi, Y., Sharma, R. **(1997)**. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*. 45(4):671-674.
- Sarni, M., Fulcrand, J., Souquet, V., Cheynier, V., Moutounet, M. **(1996)**. Stability and color of unreported wine anthocyanin derived pigments. *J. Food Sci.* 61(5):938-941.
- Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. **(2007)** Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research Int.* 40:15-21
- Shimoji, Y., Tamura, Y., Nakamura, Y., Nanda, K., Nishidai, S., Nishikawa, Y., Ishihara, N., Uenakai, K., Ohgashi, H. **(2002)** Isolation and identification of DPPH radical scavenging compounds in kurosu (Japanese unpolished rice vinegar). *J. Agric. Food Chem.* 50:6501-6503
- Sigma. **(2007)**. The ultraviolet enzymatic determination of ethyl alcohol (Ethanol).
- Simon, P. **(1997)**. Plant pigments for color and nutrition. *Hort Science*. 32(1):12-13.

- Singh, A., Selvi, T., Sharma, R. **(1999)**. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of experimental botany*. 50(339):1619-1625.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K.J. **(2009)** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Sc. Tech.* 42:448-457
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Altman, A., Kerem, Z., Flaishman, M. **(2006)** *J. Agric. Food Chem.* 54:7717-7723
- Sterling, M. **(2001)**. Anthocyanins. *Nutrition Science News.* , December. En: http://exchange.healthwell.com/nutritionsciencenews/NSN_backs/Dec_01/antho.cfm
- Sterling, M. **(2000)**. Proanthocyanin power. *Nutrition Science News.* , June. En: http://exchange.healthwell.com/nutritionsciencenews/NSN_backs/Jun_00/proantho.cfm
- Stintzing, F., Carle, R. **(2004)**. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Food science and technology*. 15:19-38.
- Stintzing, F., Stintzing, A., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R. **(2002)**. Color and antioxidant properties of cyanidin based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* 50:6172-6181.
- Stratil, P., Klejduš, B., Kubán, V. **(2006)** Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54:607-616
- Suárez, J. **(1997)** *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega.* Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Taylor, L., Brigs, W. **(1990)**. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *Plant cell.* 2:115-127.
- Toricella, R., Zamora, E., Pulido, H. **(2007)** *Evaluación sensorial aplicada a la investigación, desarrollo y control de calidad en la industria alimentaria.* 2ª Ed. Ed. Universitaria. Cuba. Pp. 14-16
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S., Kawakishi, S., Osawa, T. **(1994)** Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42:2407-2410
- Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. **(1987)**. *Fermentaciones tradicionales indígenas de México.* Nº 6. México, D.F.: Instituto Nacional Indigenista.

- Vázquez, H.J., Dacosta, O. **(2007)** Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259
- Vázquez, Y., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. **(1997)**. La reproducción de las plantas: semillas y meristemas. 1ª Ed. ed. México.: Fondo de cultura económica.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. **(1998)**. J. Agric. Food Chem. 46:4113-4117.
- Venema, G., Huis, J., Hugenholtz, J. **(1996)** Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism and applications. Antonie van Leeuwenhoek. 70(2-4):299-316.
- Wachter, R. **(2005)**. Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. En Biotecnología Alimentaria. Compiladores García, G.M., Quintero, R.R., López, M.A. México: Limusa. 313-349.
- Wang, B., Li, J., Li, Q., Zhang, H., Li, N. **(2009)** Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by Lactobacillus plantarum L2 in the rat gastrointestinal tract. Int. J. Food Microb. Accepted manuscript 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.016
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. **(1997)**. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. and food Chem. 45:304-309.
- Wrolstad, R. **(1993)**. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Station Bulletin 624, Agricultural Experiment Station, Oregon State University.
- Wu, J., Tung, Y., Wang, S., Shyur, L., Kuo, Y., Chang, S. **(2005)** Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confuse*. J. Agric. Food Chem. 53:5917-5921
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. **(1990)** Modeling of the bacterial growth curve. Ap. Env. Microb. 56(6):1875-1881

Optimization of Germination Conditions of Blue Corn (*Zea mays* L.) by Taguchi Orthogonal Array Methodology

¹D. Nava-Arenas, ²A. Jiménez-Aparicio and ¹H. Hernández-Sánchez

¹Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala, CP 11340 México, DF, México

²Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México

Abstract: A Taguchi L₉ orthogonal array methodology was used to optimize the conditions for maximal germination percentage in blue corn grains. The factors studied included steeping time, ratio of steeping water to corn grain, germination temperature and time. The optimal conditions included a steeping time of 24 h, an amount of 100 g of grain steeped in 200 mL of water and a germination time of 96 h at 25°C for a predicted germination of 90.6%. Under these conditions, 94% of the grains germinated reaching a moisture content of 43%. An increase in the range of 154 to 160% for total phenolics and 43% for anthocyanins was obtained after 96 h of germination. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) antioxidant activity increased slightly during the germination process. In conclusion, the process of germination was beneficial due to the increase in antioxidant compounds in the blue corn grain.

Key words: Germination, blue corn, optimization, Taguchi, anthocyanins, antioxidant activity

INTRODUCTION

Germination is the first step in the production of a native white or yellow corn beer called tesgüino which is consumed by several ethnic and mestizo groups in Mexico. Tesgüino is mainly consumed during ritualistic ceremonies by the Tarahumara and some other native tribes in Chihuahua but some light versions of the product are sold as refreshing beverages in the streets of several towns in Northern Mexico (Quintero-Ramírez *et al.*, 1999; Blandino *et al.*, 2003). For the preparation of tesgüino, dark-germinated corn is ground to obtain a dough which is boiled in water. Liquid portions are transferred to a clay pot and a catalyst is added. This mixture is allowed to ferment for two or three days to obtain the final product. The bacteria and yeasts isolated from tesgüino include mainly *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Saccharomyces* (Quintero-Ramírez *et al.*, 1999).

No studies are reported about the use of blue corn, which has a high content of anthocyanins, in the elaboration of tesgüino. Anthocyanins are hydrosoluble vegetable pigments responsible for the red, blue and purple color of many fruits, flowers and seeds. They

occur mainly as glycosides (Wu *et al.*, 2006). Cyanidin 3-glucoside has been identified as the major anthocyanin (75%) in Mexican blue corn from Toluca, which contains 321 mg kg⁻¹ of these compounds and 451 mg kg⁻¹ of total polyphenolic compounds (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006). These compounds may have an important role in scavenging the active oxygen species which are generated during seed germination (Bailly, 2004) and have been reported to be important in the prevention of obesity and in the amelioration of hyperglycemia in mice (Tsuda *et al.*, 2003). The use of this particular cereal could produce a tesgüino with a good content of antioxidant compounds.

Many cereals can be satisfactory malted, but corn is rarely used for this purpose because its fat becomes rancid during storage (Hough, 1991). However, it has been reported that some yellow corn varieties had good malting performance (Eneje *et al.*, 2004) and no problems have been detected when the corn malt is used immediately after its preparation for the elaboration of beer-like products like chicha or tesgüino (Quintero-Ramírez *et al.*, 1999). The main purpose of malting is the modification of the seed storage starch and protein reserves into assimilable materials for adequate yeast growth and fermentation (Ogbonna *et al.*, 2003).

Corresponding Author: Humberto Hernández-Sánchez, Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala, CP 11340 México, DF, México Tel: +52-5729-6000/62461 Fax: +52-5729-6000/62359

Germination is a process that has been optimized for some cereals (Capanzana and Buckle, 1997). Germination starts once a seed takes up water. Seed steeping is a known strategy to increase the uniformity of seed germination, but in the case of corn and rice, water-steeping also accelerates the germination process (Horii *et al.*, 2007). Steeping is normally completed in two days and then the grains are drained and spread in germination trays or incubators. There are studies indicating that the steeping and germination time and temperature affect the malting performance and fermentability of grains (Eneje *et al.*, 2004; Balogun *et al.*, 2006).

Most published optimization procedures involve response surface methodology, however, when the number of variables is high, the number of experimental runs is also very high. Reports are available on the use of Taguchi orthogonal matrix method in biotechnology, since this method examines the effects of several process variables and identifies the factors which have major effects on the process using just a few experiments (Seyedeh *et al.*, 2007).

This study reports the manipulation of steeping time, amount of steeping water and germination time and temperature for the optimization of germination percentage of blue corn using the Taguchi method. Since germination can modify the phenolic composition of seeds (López-Amorós *et al.*, 2006), the changes in phenolic compounds and anthocyanins during germination of blue corn were also studied.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in 2007 at the Escuela Nacional de Ciencias Biológicas of the Instituto Politécnico Nacional in Mexico City, DF, Mexico.

Analytical methods: The blue corn grain was purchased in the town of San Mateo Tepopula, State of Mexico (near Mexico City) and was analyzed for moisture (44-16), fat (30-10), protein (46-10), fiber (32-10), ash (08-01) and carbohydrates (80-60) by the approved methods of the AACC (AACC, 2000). The grains were physically and biologically characterized with the following parameters: hectoliter weight (Salinas-Moreno *et al.*, 2007), seed viability by the tetrazolium test (Rao *et al.*, 2006), germinative energy (Langrell and Edney, 2006), germinative capacity (Langrell and Edney, 2006) and amount of impurities (Piedade *et al.*, 2002). Phenolics were extracted with acidic methanol and measured with the Folin-Ciocalteu technique (Velioğlu *et al.*, 1998). Anthocyanins were extracted with acidic ethanol and its

Table 1: L₉ orthogonal array for the germination process

Run	Component				Germination (%)
	A (h)	B (mL)	C (°C)	D (h)	
1	72	200	20	96	52
2	24	100	20	24	10
3	48	100	25	96	74
4	24	400	30	96	68
5	72	400	25	24	36
6	48	400	20	48	44
7	24	200	25	48	76
8	48	200	30	24	34
9	72	100	30	48	30

A: Steeping time; B: Amount of steeping water per 100 g of corn grain; C: Germination temperature; D: Germination time

absorbance measured at 535 nm (Abdel-Aal and Hucl, 1999). The content of these compounds was also evaluated in white corn from the same region. The antioxidant activity was measured as DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)-radical scavenging activity. Samples (0.2 g fresh weight) were ground in a mortar at 4°C in 2.0 mL of absolute ethanol. One-half milliliter of the solution was mixed with 0.25 mL of 0.5 mM DPPH in ethanol solution and 0.5 mL of 100 mM acetate buffer (pH 5.5). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm after 30 min (Kang and Saltveit, 2002) and compared with the absorbance of a solution without sample. The inhibition (%) of the color formation was reported. All the results are shown as the average of three determinations.

Optimization of the germination conditions using the Taguchi L₉ orthogonal array methodology: The design for the L₉ orthogonal array was developed and analyzed using the Design Expert 7.0.3 software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN 55413). The factors studied included steeping time (24, 48 and 72 h), amount of steeping water (100, 200 and 400 mL water) used per 100 g of corn grain, germination temperature (20, 25 and 30°C) and time (24, 48 and 96 h). Table 1 shows the dark-germination conditions and the L₉ orthogonal array used in this study. The seeds were steeped in water and then placed into Petri dishes containing two discs of Whatman No. 1 filter paper which were moistened with distilled water to make certain that the moisture was adequate for germination (Koduru *et al.*, 2006). Controlled temperature chambers were used for seed incubation at the different temperatures. Three replicates of 100 seeds were used for each assay.

RESULTS AND DISCUSSION

Blue corn composition and properties: The results of the proximal analysis of the blue corn grain are shown in Table 2. These results are very similar to those previously reported for white and yellow corn (Haard, 1999; Eneje *et al.*, 2004).

Table 2: Blue corn grain composition

Component	Percent (w.b.)
Moisture	13.1
Fat	5.3
Protein	7.6
Fiber	2.6
Carbohydrates	70.0
Ash	1.4

Table 3: Some physical and germinative characteristics of the blue corn seeds

Characteristic	Blue corn
Impurities (%)	2.3
Hectoliter weight (kg HL ⁻¹)	70.4
Grain viability (%)	92.0
Germinative energy (%)	70.4
Germinative capacity (%)	93.0

Some other characteristics of the corn seeds are shown in Table 3. The hectoliter weight falls in the normal range for corn (61.0-73.6 kg HL⁻¹) reported by Greenway *et al.* (1977). The grain viability was relatively high. A viable seed is one, which is capable of germinating under the proper circumstances, so 92% viability could be correlated with a high probability of germination. The germinative energy and capacity for the blue corn grains (70.4 and 93%, respectively) were low compared with the values reported for white (95 and 97%) and yellow (97 and 99%) corns (Eneje *et al.*, 2004). More studies about these parameters using different varieties of blue corn from several places would be necessary to conclude adequately about the germinative properties of this pigmented seed.

The amount of anthocyanins was, as expected, considerably higher in blue than in white corn. The concentration of anthocyanins in the blue corn used in this study (540 mg kg⁻¹ corn) was higher than the content reported by Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) for American (307 mg kg⁻¹) and Mexican (321 mg kg⁻¹) blue corns. The total polyphenolic content of the white corn (1741 mg kg⁻¹) was similar to that reported by Adom and Liu (2002) for yellow corn (1758 mg kg⁻¹), however, the concentration of polyphenols in the blue corn in this study (1528 mg kg⁻¹) was considerably lower than the content indicated by Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) for a Mexican white corn from Monterrey (4899 mg kg⁻¹). The antioxidant activity for the blue corn allowed a 52% of inhibition of the DPPH color formation.

Optimization of the germination process: The optimal conditions predicted by the software included a steeping time of 24 h, an amount of 100 g of grain steeped in 200 mL of water and a germination time of 96 h at 25°C for a predicted maximal grain germination of 90.6% (Table 1). The four factors had an equal statistical importance level (25%). When these conditions were tested experimentally,

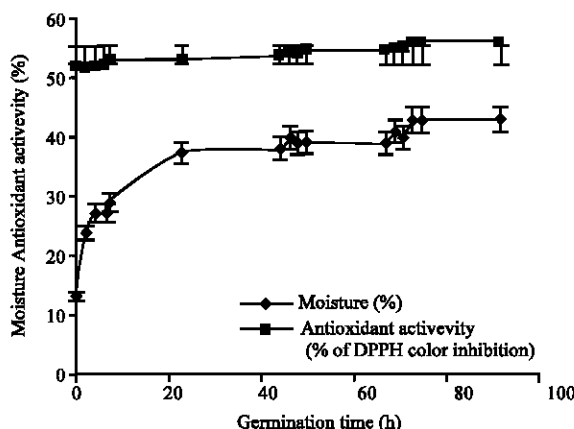


Fig. 1: Time courses of moisture content (%) and antioxidant activity (% of DPPH color inhibition) during the germination process of blue corn at 25°C

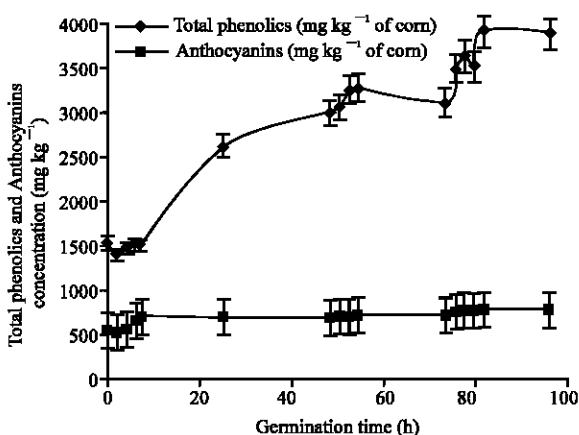


Fig. 2: Time courses of total phenolic content (mg kg⁻¹) and anthocyanins content (mg kg⁻¹) during the germination process of blue corn at 25°C

94% of the grains germinated reaching a final moisture content of 43%. The 2:1 water/grain ratio is the same proportion recommended for malting sorghum (Ogbonna *et al.*, 2003).

After the 24 h steeping period, moisture increased from 13.1 to 37.41%, phenolics increased from 1528 to 2600 mg kg⁻¹ of corn (expressed as ferulic acid) and anthocyanins increased from 540 to 678 mg kg⁻¹ of corn (expressed as cyanidine-3-glucoside). The grains were then germinated for 96 h. Moisture, phenolics and anthocyanins increased to important final contents of 43.01%, 3800 and 775 mg kg⁻¹, respectively (Fig. 1, 2). The antioxidant activity increased to 56% of inhibition of the DPPH color formation due to an increase in the content of phenolics. These results confirm the findings

of Randhir and Shetty (2005) about the developmental stimulation of total phenolics and their antioxidant activity in dark germinated sweet corn. They found that the phenylpropanoid pathway was stimulated during dark-germination of corn and consequently the total phenolic content increased to a value (4000 mg kg⁻¹) similar to the one found in this study for blue corn. They also noticed an increase in antioxidant activity to 81% DPPH inhibition after 8 days of germination. Similar increases in phenolics and antioxidant activity have also been observed during the germination of wheat, fava bean and *Lupinus angustifolius* (Yang *et al.*, 2001; Shetty *et al.*, 2003; Fernández-Orozco *et al.*, 2006). However, in the case of sorghum, germination did not affect the content of total phenolic compounds (Dicko *et al.*, 2005).

The increases in moisture, phenolic compounds and anthocyanins during the germination process could be fitted to the following equations:

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{1}{(0.03595 - 0.0023\ln t)}; R^2 = 0.942$$

$$\text{Total phenolic content (\%)} = 73.974 + 2.693t - 0.127t^2; R^2 = 0.96$$

$$\begin{aligned} \text{Anthocyanins content (\%)} &= 56.465 + 0.6284t - 0.0092t^2 \\ &+ 0.000054t^3; R^2 = 0.81 \end{aligned}$$

where, t is germination time in hours and R² is the determination coefficient of the equation fitting the data in Fig. 1 and 2.

It can be concluded that the content of anthocyanins is, as expected, considerably higher in the blue corn with respect to the white grain. However, the content of total phenolic compounds is slightly higher in the white corn. The germination process was shown to be beneficial due to the increase in anthocyanins, total phenolics and antioxidant activity in the blue corn malt. The optimization of the germination process can ensure a maximal proportion of sprouted grains and with it a higher yield of blue tescüino. This research provides a new tool for the optimization of processes such as germination.

ACKNOWLEDGMENT

The Research was supported by the Instituto Politécnico Nacional through the grant CGPI 20060568 and by COFAA-IPN fellowships.

REFERENCES

Abdel-Aal, E.S.M. and P. Hucl, 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.*, 76: 350-354.

- Adom, K.K. and R.H. Liu, 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6182-6187.
- American Association of Cereal Chemists, 2000. *Approved Methods*. 10th Edn., AACC, St. Paul, ISBN: 1-891127-12-8.
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.*, 14: 93-107.
- Balogun, R.O., S.H. Bird and J.B. Rowe, 2006. Germination temperature and time affect *in vitro* fermentability of sorghum grain. *Animal Feed Sci. Technol.*, 127: 125-132.
- Blandino, A., M.E. Al-Aseeri, S.S. Pandiella, D. Cantero and C. Webb, 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.*, 36: 527-543.
- Capanzana, M.V. and K.A. Buckle, 1997. Optimisation of germination conditions by Response Surface Methodology of a high amylase rice (*Oryza sativa*) cultivar. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30: 155-163.
- Del Pozo-Insfran, D., C.H. Brenes, S.O. Serna and S.T. Talcott, 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Res. Int.*, 39: 696-703.
- Dicko, M.H., H. Gruppen, A.S. Traore, W.J.H. Van Berkel and A.G.J. Voragen, 2005. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 2581-2588.
- Eneje, L.O., E.O. Ogu, C.U. Aloh, F.J.C. Odibo, R.C. Agu and G.H. Palmer, 2004. Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow corn varieties. *Process Biochem.*, 39: 1013-1016.
- Fernández-Orozco, R., M.K. Piskula, H. Zielinski, H. Kozłowska, J. Frias and C. Vidal-Valverde, 2006. Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. Var. Zapaton. *Eur. Food Res. Technol.*, 223: 495-502.
- Greenway, W.T., C.A. Watson and G. Davis, 1977. Factors for converting Bushel weight to hectoliter weight for six cereal grains, flax, and soybeans. *Cereal Chem.*, 54: 373-378.
- Haard, N.F., 1999. Cereals: Rationale for Fermentation. In: *Fermented Cereals. A Global Perspective*, Satin, M. (Ed.). FAO, Rome, ISBN: 912-5-104296-9, pp: 1-30.
- Horii, A., P. McCue and K. Shetty, 2007. Enhancement of seed vigour following insecticide and phenolic treatment. *Bioresour. Technol.*, 98: 623-632.
- Hough, J.S., 1991. *The Biotechnology of Malting and Brewing*. 1st Edn., Cambridge University Press, Cambridge.
- Kang, H. and M. Saltveit, 2002. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-shocked rice seedling radicles. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 513-518.

- Koduru, S., D.S. Grierson and A.J. Afolayan, 2006. Effect of high temperatures on seed germination of *Solanum aculeastrum*. Asian J. Plant Sci., 5: 353-356.
- Langrell, D.E. and M.J. Edney, 2006. Quality of Western Canadian Malting Barley. 1st Edn., Canadian Grain Commission, Winnipeg.
- López-Amorós, M.L., T. Hernández and I. Estrella, 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. J. Food Compos. Anal., 19: 277-283.
- Ogbonna, A.C., S.K.C. Obi and B.N. Okolo, 2003. Protein modification in malting sorghum. World J. Microbiol. Biotechnol., 19: 495-503.
- Piedade, F.S., H. Fonseca, E.M. Gloria, M.A. Calori, S.M. Stefano and D. Barbin, 2002. Distribution of aflatoxins in corn fractions visually segregated for defects. ras. J. Microbiol., 33: 250-254.
- Quintero-Ramírez, R., A. Lorence-Quifiones and C. Wachter-Rodarte, 1999. Cereal Fermentations in Latin American Countries. In: Fermented Cereals. A Global Perspective, Satin, M. (Ed.). FAO, Rome, pp: 99-114.
- Randhir, R. and K. Shetty, 2005. Developmental stimulation of total phenolics and related antioxidant activity in light- and dark-germinated corn by natural elicitors. Process Biochem., 40: 1721-1732.
- Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dullo, K. Ghosh, D. Nowell and M. Larinde, 2006. Manual of Seed Handling in Genebanks. 1st Edn., Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International, Rome.
- Salinas-Moreno, Y., J.J. López-Reynoso, G.B. González-Flores and G. Vázquez-Carrillo, 2007. Phenolic compounds of maize grain and their relationship with darkening in dough and tortilla. Agrociencia, 41: 295-305.
- Seyedeh, F.G.O., T. Fatemeh, B. Yakhchali and E. Feresshteh, 2007. Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. Afr. J. Biotechnol., 6: 2559-2564.
- Shetty, P., M.T. Atallah and K. Shetty, 2003. Stimulation of total phenolics, L-DOPA and antioxidant activity through proline-linked pentose phosphate pathway in response to proline and its analogue in germinating fava beans (*Vicia faba*). Process Biochem., 38: 1707-1717.
- Tsuda, T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki and T. Osawa, 2003. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J. Nutr., 133: 2125-2130.
- Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Gao and B.D. Oomah, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem., 46: 4113-4117.
- Wu, X., G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt and R.L. Prior, 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. J. Agric. Food Chem., 54: 4069-4075.
- Yang, F., T.K. Basu and B. Ooraikul, 2001. Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. Int. J. Food Sci. Nutr., 52: 319-330.