

**EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE FITATOS EN PROCESOS DE
FERMENTACIÓN EN MASAS ELABORADAS CON MAÍZ VALLE Y QPM.**

**BENAVIDEZ ALVAREZ LORENA
LATORRE CASTRO YEISON STEVENS**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
INGENIERÍA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI**

2011

**EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE FITATOS EN PROCESOS DE
FERMENTACIÓN EN MASAS ELABORADAS CON MAÍZ VALLE Y QPM.**

**BENAVIDEZ ALVAREZ LORENA
LATORRE CASTRO YEISON STEVENS**

**Director:
Cristina Ramírez T. Ph D.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
INGENIERIA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI**

2011

AGRADECIMIENTOS.

Un agradecimiento, en primer lugar a Dios,

A nuestras familias por su constante apoyo,

*A los profesores Cristina Ramírez y Germán Bolívar por contribuir grandemente en el
desarrollo de este trabajo de grado y por brindarnos su confianza,*

A todos los que contribuyeron de una u otra forma en nuestra formación académica,

A Cristina, Paola y Milton por brindarnos su amistad,

*A la Ingeniera Sandra Betancourt y al personal del Laboratorio de Microbiología Marina
por su colaboración en el desarrollo del trabajo de grado.*

TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.	4
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	4
3. REVISION DE LITERATURA.	5
3.1. MAÍZ.....	5
3.1.1. Generalidades del maíz.....	5
3.1.2. Composición nutricional del maíz.	6
3.1.3. Factores antinutricionales el maíz.	7
3.1.4. Procesamiento tradicional del maíz.....	7
3.1.5. Maíz QPM (<i>Quality Protein Maize</i>).	8
3.2. FITATOS.....	8
3.2.1. Estructura.....	8
3.2.2. Fitato y la nutrición.	10
3.2.3. Funciones biológicas.	10
3.2.4. Efectos positivos para la salud.	11
3.2.5. Fitato y el ambiente.	11
3.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FITATOS.....	12
3.3.1. Métodos cualitativos.....	12
3.3.2. Métodos cuantitativos.	12
3.4. PROCESOS DE REDUCCIÓN DE FITATOS.....	13
3.4.1. Los procesamientos mecánicos.	13
3.4.2. Los tratamientos térmicos.	14
3.4.3. El remojo.....	14
3.4.4. La germinación.	14
3.4.5. Los tratamientos enzimáticos.	15
3.4.6. Los procesos Fermentativos.....	15
3.4.7. El mejoramiento genético.....	16
3.5. FERMENTACIÓN.....	17
3.5.1. Fermentación tradicional.	18
3.5.2. Fermentación acelerada con cultivos iniciadores.....	19
3.6. BATERIAS ÁCIDO LACTICAS.....	20
3.6.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	23
4. MATERIALES Y METODOS.	24

4.1.	MATERIALES.	24
4.1.1.	Materia prima maíz.	24
4.1.2.	Material biológico bacteria ácido láctica.	24
4.1.3.	Medios de cultivo.	24
4.2.	METODOLOGIA.	26
4.2.1.	Molienda y preparación de las muestras.	26
4.2.2.	Elaboración de medio para inóculo.	26
4.2.3.	Cinética de crecimiento del inóculo de maíz.	26
4.2.4.	Elaboración de las masas fermentadas de maíz.	27
4.2.5.	Evolución del proceso de fermentación de las masas fermentadas.	27
4.2.6.	Determinación de Fósforo fítico o fitato.	30
4.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.	30
5.	RESULTADOS.	33
5.1.	CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA MAÍZ.	33
5.2.	CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA (L. plantarum C31).	33
5.3.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PH DEL INÓCULO BAL (L. plantarum C31) EN MEDIO DE HARINA DE MAÍZ.	34
5.4.	EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y EL PH DE LAS MASAS FERMENTADAS DE HARINA DE MAÍZ.	37
5.4.1.	Crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL).	37
5.4.2.	Determinación del pH.	40
5.4.3.	Crecimiento de hongos y levaduras.	42
5.5.	EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS EN LAS MASAS FERMENTADAS DE MAÍZ.	44
5.5.1.	Contenido de Azúcares totales y reductores.	44
5.5.2.	Contenido de proteínas solubles.	46
5.6.	EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL FÓSFORO FÍTICO O FITATO EN LAS MASAS FERMENTADAS DE MAÍZ.	50
5.6.1.	Contenido de fósforo fítico.	50
5.6.2.	Reducción de fósforo fítico.	51
6.	CONCLUSIONES.	55
7.	RECOMENDACIONES.	56
8.	BIBLIOGRAFIA.	57

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición de medio de cultivo MRS, Merck®	24
Tabla 2. Composición de medio de cultivo Agar Almidón.	25
Tabla 3. Composición de medio de cultivo PDA, Merk®.....	25
Tabla 4. Composición de medio de cultivo VRB, Merk®.....	25
Tabla 5. Composición de medio de cultivo de harina de maíz.	26
Tabla 6. Resumen del diseño de experimental.	31
Tabla 7. Tasa de crecimiento volumétrico (dx/dt) y la tasa específica de crecimiento (μ) para al cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> C31 en los inóculos realizados con harina de maíz de las variedades QPM y Valle.....	34
Tabla 8. Tasa de crecimiento (dx/dt) para los diferentes intervalos de tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelareda (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Miaz variedad Valle (M).	40
Table 9. Tasa o velocidad específica de crecimiento (μ) para los diferentes intervalos de tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelareda (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Miaz variedad Valle (M).	40
Table 10. Crecimiento de hongos y levaduras en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelareda (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle o común (M).	43
Tabla 11. Contenido de humedad en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).	49
Table 12. Contenido de cenizas en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).	49
Table 13. Contenido inicial de Fósforo fítico para masa elaboradas a partir de harina de variedades de maíz QPM (Q) y maíz común Valle (M).	51
Tabla 14. Análisis de varianza ANOVA para Reducción de fósforo fítico. Donde, GL: Grados de libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Cuadrados medios, Fo=MCT/MCE.....	65

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura química del ácido fítico (<i>myo</i> -inositol-1-,2,3,4,5,6 hexakisfosfato o InsP6). Los números se refieren a los átomos de carbono en el <i>myo</i> -inositol (Ins) y P a H_2PO_4 . (Fuente: Raboy, 2009).....	9
Figura 2. Imagen de la cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> C31. (a). vista a 100X después del procedimiento GRAM; (b). Colonia en medio MRS azul de anilina vista en estereoscopio.	33
Figura 3. Imagen de la prueba amilolítica de la BAL, <i>Lactobacillus plantarum</i> C31 en MRS almidón. (a). antes de ser expuesta a vapores de yodo; (b). Después de ser expuesta a vapores de yodo, formando el alo alrededor de los aros con crecimiento de la BAL.	33
Figura 4. Cinetica del inóculo de <i>L. plantarum</i> C31 del crecimiento de BAL y del pH del para inóculos realizados con una concentración 5 g./100 mL. de harina de dos variedades de maíz QPM y Valle.	34
Figura 5. Crecimiento de BAL en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y maíz variedad Valle o común (M).	39
Figura 6.	39
Figura 7. Imagen microscópica de las coloraciones Gram realizadas a colonias en las fermentaciones, vistas a 100X. (a). Fermentación acelerada (C); (b). Fermentación tradicional (S).	40
Figura 8. pH en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maiz variedad Valle o común (M).	42
Figura 9. Imagen del crecimiento de Hongos y levaduras en el tiempo de 24 horas de fermentación para: (a). MS, variedad de maíz Valle y fermentación tradicional; (b). QS, variedad de maíz QPM y tipo de fermentación tradicional; (c) QC variedad de maiz QPM y la fermentacion acelerada.	44
Figura 10. Imagen de la prueba de enterobacterias y/o coliformes, realizadas en los diferentes tiempos de proceso, en las fermentaciones tradicional y acelerada en masas elaboradas a partir masas de harina de maíz de la variedad QPM y Valle.	44

Figura 11. Concentración de azúcares totales en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle o común (M).	46
Figura 12. Concentración de azúcares reductores en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M)	46
Figura 13. Concentración de proteínas solubles en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).	49
Figura 14. Contenido de fósforo fítico en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C), en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle (M); con su respectivo intervalo Tukey ($p<0,05$).	51
Figura 15. Reducción de fósforo fítico en el tiempo, para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C), en las masas de harina de maíz QPM(Q) y maíz variedad Valle o común (M); con su respectivo intervalo Tukey ($p<0,05$).	54

RESUMEN.

El presente estudio buscó establecer la reducción de fósforo fítico en masas obtenidas por procesos de fermentación en dos variedades de maíz, en donde fueron comparados los resultados obtenidos en la fermentación láctica acelerada con adición de un inóculo de bacteria ácido láctica (BAL) *Lactobacillus plantarum* y la fermentación tradicional debida a la microflora presente naturalmente en el maíz, en estas fermentaciones se obtuvieron masas de harina de maíz QPM (maíz de alta calidad proteica) y maíz común (variedad Valle); evaluándose tiempos de proceso de 24, 36 y 48 horas, en los cuales se valoró la calidad microbiológica, el pH, contenido de azúcares totales, azúcares reductores y proteínas solubles. Por último se analizó estadísticamente ($p < 0,05$) el contenido de fósforo fítico y el porcentaje de reducción del mismo, encontrando que todos los factores (variedad de maíz, tipo de fermentación, tiempo de fermentación y sus respectivas las interacciones), presentaron diferencias significativas en el contenido de fósforo fítico y la reducción del mismo. Donde las masas elaboradas de harina de maíz QPM presentaron un mayor contenido de fósforo fítico, los tiempos de fermentación de 24 horas no redujeron significativamente ($p < 0,05$) el contenido de fósforo fítico, la fermentación acelerada en el maíz común (Valle) logró reducir el fósforo fítico en un (30,6-44,2)% y al transcurrir las 36 horas de proceso en la fermentación tradicional y acelerada en el maíz QPM se logró una reducción (19,8-33,1)%. Igualmente, se evidenció por medio de análisis microbiológicos que en la fermentación tradicional en el maíz QPM y Valle, estuvieron presentes diferentes cepas tanto de bacterias lácticas como de otros microorganismos mesófilos, en el maíz QPM también se presentaron hongos y levaduras en el desarrollo de esta fermentación. Con la fermentación acelerada con inóculo de BAL se redujo el tiempo de proceso de 48 a 36 horas, también se mejoró la calidad microbiológica, la inhibición de hongos, conservación de las proteínas solubles y reducción de fósforo fítico comparados con los resultados obtenidos en la fermentación tradicional. Con estos resultados se logró concluir que el uso de microorganismos lácticos (*Lactobacillus plantarum*) en el proceso de fermentación de masas de maíz, mostró ser un método aplicable para la reducción de fósforo fítico y de gran utilidad para mejorar la calidad microbiológica de las masas. Este método podría ser aplicado a procesos industriales tendiendo a la mejora de la calidad de los productos derivados a partir de las masas maíz.

Palabras Claves : Fosforo Fítico, Maíz, Fermentación, Bacterias Lácticas, Fitatos,

Lactobacillus plantarum.

ABSTRACT.

This study sought to establish the reduction of phytic phosphorus masses obtained by fermentation processes in two varieties of corn, which were compared the results of accelerated lactic fermentation with the addition of an inoculum of lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus plantarum* and traditional fermentation due to the microflora naturally present in maize, were obtained in these fermentations masses QPM flour (high quality protein maize) and corn (variety Valle); evaluating process times of 24, 36 and 48 hours in which we evaluated the microbiological quality, pH, total sugar content, reducing sugars and soluble proteins. Finally analyzed statistically ($p < 0.05$) phytate phosphorus content and the same percentage reduction, finding that all factors (maize variety, type of fermentation, fermentation time and their interactions), presented significant differences in the phytate phosphorus content and reduction. Where the masses developed QPM flour had a higher content of phytate phosphorus, fermentation times of 24 hours did not significantly ($p < 0.05$) phytate phosphorus content, rapid fermentation in corn (Valle) managed to reduce the phytate phosphorus in (30.6 to 44.2)% and pass 36 hours of the traditional fermentation process and accelerated in the QPM there was a reduction (from 19.8 to 33.1)%. Also evidenced by means of microbiological analysis in the traditional fermentation in the QPM and Valle, different strains were present both lactic acid bacteria and other mesophilic microorganisms in the QPM also had fungi and yeasts in the development of this fermentation. With the rapid fermentation of LAB inoculum was reduced processing time from 48 to 36 hours, also improved the microbiological quality, inhibition of fungal conservation of soluble proteins and phytate phosphorus reduction compared with the results obtained in the fermentation traditional. These results are able to conclude that the use of lactic microorganisms (*Lactobacillus plantarum*) in the fermentation of corn mass was shown to be an applicable method for reducing phytate phosphorus and useful to improve the microbiological quality of the masses. This method could be applied to industrial processes tend to improve the quality of products derived from corn masses.

1. INTRODUCCIÓN.

El maíz es un cereal domesticado que se ha cultivado por decenas de miles de años como alimento para consumo humano y animal. Actualmente, es el cereal más cultivado en el mundo (Naqvi *et al.*, 2011), es la fuente principal de alimento para millones de personas, en particular en Latinoamérica y África (Helland *et al.*, 2004), también es usado como materia prima para la elaboración de productos industriales desde adhesivos hasta biocombustibles (Naqvi *et al.*, 2011) (Chuck-Hernandez *et al.*, 2009).

En la alimentación el maíz es una fuente rica en carbohidratos y proteínas, en menor contiene proporción de minerales, entre ellos el hierro y el zinc (4.8 - 4.6 mg/100g) respectivamente (FAO, 1993). Aunque, la mayoría de contenido proteico es de poca calidad por la falta de aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (Fageer *et al.*, 2004), por esta razón la ingeniería genética ha desarrollado variedades de maíz con alta calidad proteica (QPM) que es un maíz con rendimientos y propiedades agronómicas iguales al maíz normal, pero con altos niveles de lisina y triptófano (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004). Además, de los desafíos nutricionales relacionados con la calidad proteica, el maíz posee un contenido de antinutrientes (Lestienne *et al.*, 2005), como el ácido fítico *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfatodihidrogeno (IP6) este compuesto tiene una fuerte capacidad de quelar iones metálicos multivalentes, especialmente zinc, calcio y hierro, esta unión puede dar lugar a sales muy insolubles con baja biodisponibilidad de minerales, llamadas fitatos (García-Esteva *et al.*, 1999). Los fitatos son compuestos que pueden representar del 1,0 por ciento del peso seco de una semilla típica, y es un 75,0 % del fósforo total de la semilla (Raboy, 2003), siendo el almacenamiento principal de fósforo de la misma (Hurrell, 2004). Igualmente, la capacidad del IP6 de formar sales insolubles con minerales y algunas proteínas (Mahgoub y Elhag, 1998), reduce la disponibilidad de los nutrientes con que se une y del mismo fósforo (Raboy, 2009). Algunos estudios han comprobado que los animales monogástricos no son capaces de absorber estos nutrientes, lo cual podría provocar desnutrición en poblaciones donde la mayor parte de su dieta la constituye los cereales como el maíz y causar la presencia de anemia, por deficiencia de hierro (Hurrell, 1997) o disminución de la tasa de crecimiento debido a deficiencia de zinc (Lestienne *et al.*, 2005). A pesar de que son bien conocidos los estudios que indican el efecto antinutriente de la molécula de fitato (Raboy, 2009), algunos estudios contrastan otorgando al ácido fítico propiedades beneficiosas para la salud al considerarlo un agente antioxidante. (Graf y Eaton, 1993) (Park *et al.*, 2006).

Los procedimientos industriales y tradicionales más comunes aplicados al maíz pueden llegar a reducir el fósforo fítico mediante degradación enzimática y no enzimática, incluyendo tratamientos físicos, térmicos, químicos, enzimáticos y/o microbiológicos; como la molienda, la cocción, el autoclavado, el remojo, el germinado y la fermentación (Mahgoub y Elhag, 1998). Donde la fermentación es uno de los procesos que logra una mayor reducción de factores antinutricionales (Liang *et al.*, 2008), debido a el aporte de fitasas microbianas o la misma activación de las fitasas endógenas de las semillas, que ocasionan la degradación del contenido en ácido fítico (Mahgoub y Elhag, 1998). No obstante, este proceso requiere un conocimiento adicional y le otorga características organolépticas favorables a los productos obtenidos (Lestienne *et al.*, 2005). Otra manera de reducir estos antinutrientes es la adición de fitasa exógena, elaborada principalmente por bacterias y levaduras (Frontela *et al.*, 2008). De las metodologías más novedosas de reducción de fitatos involucra el fitomejoramiento y la tecnología genética en la semilla, que produce cultivos de maíz bajo el ácido fítico (LPA) (Raboy *et al.*, 2000) (Raboy, 2009), algunos de los limitantes de esta tecnología es que el ácido fítico participa en procesos metabólicos del desarrollo de la semilla, que convierte en un reto mantener los bajos niveles de fitato y a la misma vez la función, calidad y rendimiento de la planta. (Raboy, 2009).

La producción de alimentos fermentados es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antiguos conocidos por el hombre (Motarjemi *et al.*, 2002), hoy en día una gran variedad de alimentos fermentados se produce en países industrializados y en desarrollo, obteniendo productos tradicionales como: el *Kenkey* (Ghana), el *Ogi* (Nigeria), Chicha (Sur América) y masas acidas en la elaboración tamales y empanadas (Colombia) (Hammond y Jez, 2011) (Vanegas, 2009). Donde la fermentación es usada principalmente debido a su calidad de conservación en condiciones ambientales, y también por su seguridad y aceptación. (Holzapfel, 2002). Además, por la capacidad de aumentar calidad nutricional de los alimentos ya que produce un aumento en digestibilidad de nutrientes (Caplice y Fitzgerald, 1999), en la industrialización de la fermentación se ha encontrado que la aplicación de un cultivo iniciador o inóculo mejora de la higiene, seguridad y control de calidad. Aunque implica un reto el mantenimiento y preservación del cultivo (Holzapfel, 2002).

En la fermentación los microorganismos producen fitasas moléculas capaces de hidrolizar el inositol fosfato IP6 en inositoles fosfato menores a 5 (IP<5), estos últimos no poseen

características antinutricionales, la fermentación acidoláctica aumenta la acidez, produciendo un medio óptimo para la activación de fitasas endógena presente en el cereal, originándose de forma paralela la formación de compuestos solubles de Fe y ácidos orgánicos (Bering *et al.*, 2006), la fermentación está presente en productos tradicionales de África y Latinoamérica, se produce cuando el grano de maíz es humidificado comenzando un proceso de fermentación espontánea resultado de la flora natural del cereal (Caplice y Fitzgerald, 1999), este proceso puede ser industrializado y realizado de forma eficiente a través de una fermentación láctica acelerada con el uso de un cultivo iniciador de cepa de bacteria láctica aislada de productos tradicionales, la fermentación acelerada comparada con el proceso tradicional aunque es más tecnificado reduce el tiempo de proceso (Holzapfel, 2002), es más segura al reducir rápidamente microorganismos patógenos, la contaminación por hongos por ende sus efectos tóxicos debida a la producción de micotoxinas como las aflatoxinas (Rasmussen *et al.*, 2011). De este modo, se pueden conservar los productos tradicionales de cada región, con calidades fisicoquímicas y microbiológicas que encuadren dentro de las normas o códigos internacionales (Abbas *et al.*, 2006) (Rasmussen *et al.*, 2011).

En este estudio, se buscó comparar la fermentación láctica acelerada con adición de un inóculo con una concentración conocida de BAL y la fermentación tradicional debida a microflora presente naturalmente en maíz, evaluando diferentes tiempos de proceso aplicado a harina de maíz de la variedad Valle y la variedad QPM. Con el fin de establecer diferencias significativas, al encontrar cuál de los diferentes factores intervienen con mayor importancia en el contenido y reducción de fitatos en el maíz.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la reducción de fitatos en procesos de fermentación en masas elaboradas a partir de las variedades de maíz Valle y QPM.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer el tiempo adecuado de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* en un medio de harina de maíz para el desarrollo del inóculo en la fermentación láctica acelerada.
- Determinar el efecto de los procesos de fermentación en las características microbiológicas y fisicoquímicas de las masas elaboradas con variedades de maíz Valle y QPM.
- Evaluar el efecto de la fermentación tradicional y la fermentación láctica acelerada en el contenido y reducción de fósforo fítico en masas elaboradas con variedades de maíz Valle y QPM.

3. REVISION DE LITERATURA.

3.1. MAIZ.

3.1.1. Generalidades del maíz.

El Maíz (*Zea mays*.) es un cereal cultivado como alimento humano y animal hace decenas de miles de años, es el cereal más cultivado en el mundo con 820 millones de toneladas producidas en la temporada 2010-2011 (USDA, 2011), es un cultivo importante tanto producción industrial de alimentos como en las preparaciones tradicionales (Hammond y Jez, 2011), también es aprovechado como materia prima como jarabes de glucosa y aceite vegetal que son aprovechados por la industria alimentos, sin embargo su uso va más allá de la industria alimentaria y abarca desde la producción de aceites industriales, carbohidratos poliméricos, hasta al obtención de productos químicos utilizados en la fabricación de adhesivos, cosméticos, detergentes, papel y textiles (Naqvi *et al.*, 2011). En los últimos años el maíz también ha sido aprovechado para la producción de etanol conocido como bioetanol (Chuck-Hernandez *et al.*, 2009). En la actualidad, casi la totalidad de la producción de etanol en el mundo se obtiene a partir de dos de los principales cultivos el maíz y la caña de azúcar, donde los Estados Unidos y Brasil son los líderes mundiales, los Estados Unidos obtiene el 90% de su bioetanol del maíz, con una capacidad de más de 15 mil millones litros por año (Chuck-Hernandez *et al.*, 2009). Hasta el año 2005 el precio del maíz iba en descenso, a partir de este año el precio del maíz aumentó hasta triplicar su valor en el 2008, el banco mundial en este mismo año publicó un informe donde concluyó que los biocombustibles producidos a partir de los granos fueron los responsables de una parte del aumento de los precios del grano, comenzando un debate sobre la seguridad alimentaria que se afectada por este fenómeno (Naqvi *et al.*, 2011). En países en desarrollo no es viable el uso de maíz y otros cultivos para la producción de etanol debido a motivos económicos, agronómicos o consideraciones sociales (Chuck-Hernandez *et al.*, 2009).

En el 2009 se importaron cerca de dos millones de toneladas de maíz amarillo de países como Argentina, Brasil, Ecuador, Estados Unidos y Paraguay. Donde, argentina representó el 44% de las importaciones (Fenalce, 2009). En Colombia en el primer semestre del año 2009, se produjeron 911 mil toneladas entre maíz amarillo y blanco

(Fenalce, 2009). Donde el maíz amarillo tecnificado representó 56 % del maíz producido, donde el Valle del Cauca participó con el 15% de la producción (Fenalce, 2009).

El consumo de maíz en Colombia en el año 2008 estaba en tres millones toneladas y es el principal alimento de importación según (FAO, 2011), y el consumo per capital (Kg/Habitante/año) de maíz en Colombia en el año 2008 estuvo en 95.4 de maíz amarillo y 14.3 de maíz blanco (Fenalce, 2009). Donde el maíz aportaba en 2008 cerca de 12% de la proteína consumida en Colombia. Sin embargo, ésta es de origen vegetal y tiene menor contenido de aminoácidos esenciales y digestibilidad que la animal (FAO, 2011).

La mayoría de la población en países en desarrollo depende principalmente de los granos de cereales como alimento básico, debido a ingresos limitados y los altos precios de los alimentos de origen animal. Al igual que otros cereales, el maíz nutricionalmente no cubre estas deficiencias en la alimentación, debido a su deficiencia en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano (Fageer *et al.*, 2004).

3.1.2. Composición nutricional del maíz.

Más de la mitad de la masa de una semilla de maíz son hidratos de carbono, principalmente almidón, el maíz amarillo dentado integral tiene aproximadamente 61% de almidón, 19.2 % de proteína y fibra, 16% de humedad, 3,8 % de contenido graso. (Naqvi *et al.*, 2011). El almidón se almacena en forma de gránulos y se compone principalmente de dos tipos de α -glucano: amilosa y amilopectina (Naqvi *et al.*, 2011), la proporción de amilosa y amilopectina en el almidón determina sus propiedades físicas y químicas, por lo tanto su uso final (Naqvi *et al.*, 2011). Sin embargo, contiene en menor proporción que el almidón, otros carbohidratos como los fructanos que son polímeros de la fructosa. (Naqvi *et al.*, 2011).

El maíz contiene a 7-13 g/100 g de proteínas en base seca, no obstante la calidad de estas es escasa porque son deficientes en aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004), estos aminoácidos son esenciales al no poder ser sintetizados por el cuerpo humano, por esta razón deben ser obtenidos a través de la dieta. Por lo tanto la deficiencia de triptófano y lisina son prevalentes en los países en desarrollo, donde el maíz es la fuente única o predominante de los alimentos (Naqvi *et al.*, 2011).

La proteína del grano del maíz se pueden separar en seis fracciones de solubilidad es decir, la albúmina, globulina, zeína, G1-glutelina, G2-glutelina y G3-glutelina. La proteína

soluble en alcohol (zeína) representa aproximadamente el 50% de la proteína del endospermo total, que se caracteriza por un alto contenido en glutamina, leucina, prolina y particularmente carente de lisina y triptófano. El contenido total de lisina y triptófano del maíz normal son sólo el 1,8% y 0,35, respectivamente (Fageer *et al.*, 2004).

Los cereales como el maíz son generalmente deficientes en la mayoría de vitaminas y minerales, una porción típica de 100 g de semillas contiene aproximadamente el 10-15% de la ingesta diaria recomendada de vitaminas del complejo B y vitamina C, pero sólo el 1% de vitamina A. Asimismo, las semillas de maíz son fuentes pobres en selenio, magnesio y potasio. (Naqvi *et al.*, 2011). El maíz contiene bajo contenido de hierro y zinc (4.8 - 4.6 mg/100g) en comparación al elevado contenido de fósforo (300mg/100g) (FAO, 1993).

3.1.3. Factores antinutricionales el maíz.

La calidad nutricional del maíz está determinada principalmente por su composición química y la presencia de factores antinutricionales, tales como el ácido fítico o fitato que es la forma principal de almacenamiento de fosfato, por doquier distribuidos en las plantas, sobre todo en los cereales y las legumbres. Los efectos del ácido fítico en la nutrición humana y animal están relacionados con la interacción del mismo con proteínas, vitaminas y minerales, limitando su biodisponibilidad (Fageer *et al.*, 2004). En el maíz más del 80% del contenido de ácido fítico del grano se encuentra en el germen, y el resto en la capa de aleurona (Raboy, 2009) (Hotz y Gibson, 2011).

3.1.4. Procesamiento tradicional del maíz.

El maíz es la fuente principal de alimento para millones de personas en el mundo, en particular en Latinoamérica y África (Helland *et al.*, 2004), el grano generalmente no se consume crudo, sino que requiere algún tipo de procesamiento como el remojo, molido, tamizado, cocción, nixtamalizado y/o fermentado (Hammond y Jez, 2011), obteniendo productos tradicionales particulares en cada área del mundo. En África y Asia, el maíz está generalmente es molido en sémola gruesa, y las harinas son usadas para la producción de panes planos no fermentados y fermentados, en comidas tratadas al vapor, bocadillos, palomitas de maíz o bebidas alcohólicas (Hammond y Jez, 2011). En Latinoamérica, el maíz es procesado en tortillas, arepas, cuscús, polenta, y en diversas comidas y bebidas (Hammond y Jez, 2011), Los alimentos tradicionalmente procesados

en Colombia a partir del maíz son las arepas, tamales, hallacas, empanadas entre otras (Hammond y Jez, 2011).

3.1.5. Maíz QPM (*Quality Protein Maize*).

Los diversos usos del maíz reflejan su larga historia como un cultivo domesticado y su acervo genético amplio (Gewin, 2003) (Naqvi *et al.*, 2011). El mejoramiento genético del maíz ha desempeñado un papel clave en el desarrollo de genotipos con alta cantidad y calidad de proteínas (Fageer *et al.*, 2004). Los maíces de alto valor nutritivo también son llamados QPM (*Quality Protein Maize*), maíz de alta calidad proteica, y han sido desarrollados obteniendo maíces opacos con características agronómicas similares a los maíces normales. Los nuevos genotipos fueron desarrollados por el CIMMYT, (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), a través de un largo período de selección y retrocruzamiento (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2006), esta calidad proteica es dada por los altos niveles de lisina y triptófano que se traduce en mayor contenido de aminoácidos esenciales y presentan bajos contenidos de otras proteínas (por ejemplo α y β -zeínas). La lisina y triptófano en el QPM puede proporcionar hasta un 73% de las necesidades de proteína humana, en comparación con el 28-50% para el maíz común. (Naqvi *et al.*, 2011). Los maíces QPM están siendo utilizados en muchos países en desarrollo, especialmente de Centro América y África, con muy buenos resultados nutricionales en niños y enfermos. Esta variedad de maíz posee también buenas propiedades nutritivas en animales monogástricos, como cerdos y gallinas. Por lo cual también es muy estimado como fuente de alimentación para este tipo de animales (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2006).

3.2. FITATOS.

3.2.1. Estructura.

El ácido fítico *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexaquisfosfatodihidrogeno (Ins P6 o IP6) (figura 1) químicamente es el éster fosfórico del hexahidroxíciclohexano (inositol), un alcohol cíclico derivado de la glucosa (Raboy, 2003), fue descrita por primera vez como una forma abundante de fósforo y como un compuesto de almacenamiento principal de fósforo en las semillas de las plantas como los granos de cereales (Raboy, 2003) (Hurrell, 2004) (Frontela *et al.*, 2008) (García-Esteva *et al.*, 1999), puesto que el IP6 es alrededor del 75% del contenido del fósforo total de la semilla (Raboy, 2009) y representa aproximadamente el 1-2% del peso total de la semilla y en ocasiones podría llegar a ser 6.3% (Febles *et al.*, 2001) (Palacios *et al.*, 2008). El ácido fítico se encuentra ampliamente

distribuido en alimentos de consumo habitual, sobre en los de origen vegetal, se localiza en altas concentraciones en las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas, en menor cantidad en los tubérculos y hortalizas (Febles *et al*, 2001).

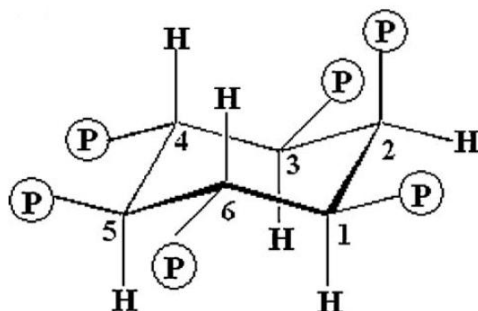


Figura 1. Estructura química del ácido fítico (*myo*-inositol-1-,2,3,4,5,6 hexakisfosfato o InsP6). Los números se refieren a los átomos de carbono en el *myo*-inositol (Ins) y P a H_2PO_4 . (Fuente: Raboy, 2009).

En las semillas en desarrollo se acumulan más fósforo (P) de lo necesario para la función celular y sintetizan este exceso de fósforo en ácido fítico para posteriormente depositarlo en forma de sales mixtas de macronutrientes y minerales, conocido como “fitinas” o “fitato” (Raboy, 2009). El fitato se encuentra en la semilla como sales minerales de cationes Fe, K, Mg, Ca, Mn o Zn (Raboy, 2003), debido a que el ácido fítico tiene una fuerte afinidad para quelar iones multivalentes de metales, especialmente hierro, zinc y calcio, lo que da lugar a la formación a sales insolubles minerales de baja biodisponibilidad (Hurrell, 2004) (Frontela *et al.*, 2008), esto convierte al IP6 en uno de los supresores principales de la disponibilidad de cationes bivalentes como Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} (Liang *et al.*, 2008), sumado al hecho de los animales no rumiantes poseen cantidades insignificantes de fitasas endógenas. Las fitasas son las enzimas necesarias para hidrolizar el ácido fítico (Peter y Baker, 2002), convirtiendo fosfatos de inositol IP6, a pentafofosfato inositol (IP5), tetrafosfato inositol (IP4), inositol trifosfato (IP3) y posiblemente a di-monofosfato y inositol, dado que sólo el IP6 e IP5 pueden tener un efecto negativo sobre la biodisponibilidad de minerales, pues los demás productos hidrolíticos poseen una pobre capacidad de quelación con los minerales y demás nutrientes, formando complejos más solubles (García-Esteva *et al.*, 1999). Este proceso enzimático puede ocurrir o favorecerse durante el almacenamiento, fermentación, germinación, el remojo y la cocción de los alimentos, y en la digestión en el intestino humano (García-Esteva *et al.*, 1999),

además las fitasas son producidos por una gran variedad de plantas, hongos bacterias y levaduras (Pandey *et al.*, 2001).

3.2.2. Fitato y la nutrición.

Los seres humanos tienen una capacidad limitada para hidrolizar la molécula de fitato, ya que el fósforo del fitato no está disponible (Febles *et al.*, 2001). además de impedir la biodisponibilidad de los minerales, los estudios *in vitro* han demostrado que el fitato también forma complejos con proteínas convirtiéndolas en moléculas insolubles, desmejorando su biodisponibilidad y haciéndolas menos propensas al ataque de enzimas proteolíticas (Febles *et al.*, 2001).

El ácido fítico es parte de la dieta humana y animal, al estar presente muchos los alimentos de origen vegetal especialmente en semillas y cereales. El ácido fítico puede ser considerado una sustancia natural antinutriente dado que interfiere con la función de nutrientes esenciales entre ellos los minerales, (Febles *et al.*, 2001) (Park *et al.*, 2006). Una de las implicaciones en animales monogástricos (aves, cerdos, peces) es la utilización deficiente de minerales y proteínas. (Raboy, 2009), ya que la mayoría de fósforo y minerales en sales compuestas por ácido fítico no se utilizan y son excretados, lo que podría contribuir a la deficiencia nutricional en las poblaciones humanas. (Hurrell, 2003) (Raboy, 2009).

La presencia del compuesto fitato en el maíz no implica la existencia de problemas de toxicidad aguda. Sin embargo, puede causar deficiencia de minerales como el hierro la cual está relacionada con complicaciones como la anemia, la disminución significativa en el desarrollo psicomotor y mental, y el estado inmune reducido (Hurrell, 2004) (Frontela *et al.*, 2008). Dietas con alta cantidad de IP6 pueden afectar la absorción de calcio, afectando el desarrollo la masa ósea, aumentando el riesgo de fracturas y osteoporosis (Frank *et al.*, 2006) (Frontela *et al.*, 2008). La deficiencia de zinc puede conducir a un aumento en la incidencia de infecciones diarreicas y respiratorias, así como la disminución de las tasas de crecimiento (Frontela *et al.*, 2008). Las poblaciones con hábitos vegetarianos o de países en desarrollo son las más afectadas por el contenido de ácido fítico en su dieta, por ende la baja disponibilidad de los minerales (Febles *et al.*, 2001).

3.2.3. Funciones biológicas.

Se descubrió que el IP6 es un componente común en las células eucariotas y su metabolismo un componente básico de la limpieza celular. (Raboy, 2003), igualmente en

las células vegetales tiene un gran número de funciones, además de su papel clásico en el almacenamiento de fósforo y minerales en las semillas y otros tejidos vegetales. (Raboy, 2003), además es un componente clave de muchos procesos de desarrollo, regulación y señalización en la plantas (Raboy, 2009). Asimismo es posible efector o está ligado a procesos como regeneración en el ATP, exportación en el ARN y la reparación en el ADN, y posee propiedades antioxidantes en la célula (Raboy, 2003).

3.2.4. Efectos positivos para la salud.

Además de sus conocidas propiedades negativas de antinutriente el fitato, al ser quelante eficiente de los iones de hierro, puede actuar como antioxidante, mediante la eliminación de hierro libre que cataliza la reacción de Fenton (Raboy, 2009) (Graf y Eaton, 1993) (Park *et al.*, 2006). Igualmente, puede dar lugar a una reducción favorable en la formación de radicales hidroxilo en el colon (Graf y Eaton, 1993), el efecto también es positivo contra la carcinogénesis, lo cual se ha demostrado con sistemas de cultivo celular in vitro, ratones, ratas y conejillos de indias, sin embargo el mecanismo de acción no se ha entendido completamente (García-Esteva *et al.*, 1999). También son conocidos estudios donde el ácido fítico tiene un papel beneficioso para la salud en con su efecto anticancerígeno (Shamsuddin *et al.*, 2002) (Raboy, 2009), lo anterior genera una gran controversia en cuanto a la conveniencia de su eliminación de los alimentos (Febles *et al.*, 2001), sin embargo la reducción del mismo sigue siendo importante debido a la falta evidencia clínica de estas funciones beneficiosas, en contraste con la abundante prueba para el papel negativo de ácido fítico en tanto la nutrición humana y animal, la agricultura y el medio ambiente (Raboy, 2009).

3.2.5. Fitato y el ambiente.

El fitato de semillas representa un importante cuello de botella en el flujo de fósforo a través de la ecología agrícola del mundo por su posible impacto ambiental en la producción animal. (Raboy, 2009). ya que aproximadamente el 75% del fósforo total en las plantas se sintetiza en ácido fítico y solo el 20-30% de P total de la semilla que no es P fítico se encuentra disponible, sumado al hecho que los no rumiantes poseen cantidades insignificantes de fitasas endógenas que son necesarias para hidrolizar el ácido fítico (Peter y Baker, 2002) (Raboy, 2009), lo anteriormente mencionado genera que el exceso de fósforo en los alimentos termine en el estiércol y represente un problema de gestión de residuos significativo (Raboy, 2009), constituyendo una posible contaminación de

ambientes como aguas subterráneas, lagos y lagunas (Peter y Baker, 2002) (Raboy, 2009).

3.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FITATOS.

Los métodos de determinación del ácido fítico se pueden dividir en cualitativo y cuantitativos.

3.3.1. Métodos cualitativos.

Harland y Oberleas (1986) llevaron a cabo una revisión de los métodos cualitativos de separación e identificación de los inositoles fosfato. En ésta, destacan la cromatografía en papel, la electroforesis o el empleo del microscopio de luz polarizada.

3.3.2. Métodos cuantitativos.

Los métodos cuantitativos de determinación del ácido fítico son los más empleados. Latta y Eskin (1980) emplearon para este fin un método basado en la precipitación de las sales insolubles del ácido fítico, el cual es un método colorimétrico basado en la reacción de iones de hierro con el ácido sulfosalicílico, que debido a su sencillez y a su bajo costo se sigue empleando actualmente.

En 1986, la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) adoptó como método oficial de determinación de fitatos en alimentos el descrito por (Harland y Oberleas, 1986), en este método los fitatos son extraídos con HCL y purificados en una columna de intercambio aniónico, los extractos son mezclados con ácido sulfosalicílico, para la posterior medida colorimétrica.

Los métodos coloriméricamente usados poseen una desventaja en relación a métodos basados en cromatografía líquida debido a que no tienen la posibilidad de separar los diferentes inositoles fosfatos y cuantificarlos individualmente. En 1986 se desarrolló por Sandberg y Ahderinne un método para la determinación de inosoles fosfatos basado en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual demostró que IP3, IP4, IP5 e IP6 podrían separarse ajustando el pH; resultados que no se obtienen en el método oficial de Harland y Oberleas (1986) que no permite detectar los isómeros de inositol hexafosfato.

En 1994, Lehrfeld con el objetivo de resolver los problemas planteados hasta el momento en la determinación de ácido fítico mediante HPLC, desarrolló un método de extracción y determinación de ácido fítico e inositoles de un menor número de fosfatos consistente en la utilización de resinas de intercambio aniónico para concentrar y purificar el ácido fítico e

isómeros para su posterior determinación mediante HPLC. También, Lolas et al., 1976 propusieron, un método de determinación que tomó en consideración, el hecho de que el ácido fítico es una proporción del fósforo total en las cereales.

Un estudio llevado a cabo por Sandoval, 2005, en el cual se determinó el contenido de ácido fítico por el método colorimétrico a diferentes poblaciones de frijol, estableció que existe una relación entre el contenido de fitatos y el fósforo total de la semilla, los cuales se apoyan en razonamientos establecidos por Raboy, 2003, que encontró que el 76% del fósforo total en el grano corresponde al fósforo fítico. Una evaluación de la reducción de ácido fítico fue realizada por Cárdenas, 2006 a un proceso de ultrafiltración a agua del cocimiento del maíz, en la cual consideró, el contenido de fósforo fítico como un porcentaje del fósforo total.

3.4. PROCESOS DE REDUCCIÓN DE FITATOS.

En los procesos tanto industriales como domésticos aplicados al maíz tienen efecto de degradación de fitatos, lo cual es conveniente con el fin de superar los efectos negativos sobre la biodisponibilidad en especial de los minerales, tales como el remojo, fermentación, molienda, tostado o la germinación que han demostrado la disminución del contenido de fitatos de los cereales (García-Esteva et al., 1999) (Fageer et al., 2004) (Lestienne et al., 2005) (Frontela et al., 2008). Los métodos que pueden reducir el fítico de los cereales manteniéndola máxima cantidad de micronutrientes son los más efectivos, y estos incluyen remojo, fermentación y germinación (Hotz y Gibson, 2007), los cuales al reducir el ácido fítico incrementan la solubilidad de minerales en los alimentos, mejorando la biodisponibilidad de los mismos (Liang et al., 2008). No obstante, estudios han encontrado algunos tratamientos industriales son incapaces de reducir el contenido de fitato a un nivel aceptable para la óptima absorción de minerales, lo cual es confirmado por la presencia de fitatos en las muestras comerciales, que han sido sometidas a la transformación industrial estándar (Frontela et al., 2008).

3.4.1. Los procesamientos mecánicos.

En procesos aplicados a cereales como el descascarillado y/o extracción por molienda, se puede reducir grandes cantidades de ácido fítico debido a la eliminación en el grano de las capas exteriores, salvado y/o el germen, donde se concentra el ácido fítico (Mahgoub y Elhag, 1998), como en la aleurona en el arroz, el sorgo, y el trigo; y en el germen en el maíz (Raboy, 2009). Por lo tanto, la biodisponibilidad de hierro, zinc, y el calcio pueden ser

realizados. Aunque, en estos procesos disminuye simultáneamente, el contenido de minerales y algunas vitaminas de estos cereales golpeados, por esta razón en algunos países industrializados, las harinas molidas del cereal son enriquecidas para compensar los micronutrientes perdidos (Hotz y Gibson, 2007).

3.4.2. Los tratamientos térmicos.

Se ha reportado la reducción de ácido fítico debida a la cocción en cereales. En algunas investigaciones encontraron que el cocción del maíz, arroz, sorgo y semillas de soja redujo el contenido en ácido fítico entre un (16-31%), en el centeno cuando la harina se cocinó a 100°C no hubo una reducción significativa del fitato, en cambio cuando esta estaba a 170° hubo una reducción de 23 % (Fageer *et al.*, 2004). Esta reducción puede deberse a la activación de la enzima fitasa durante la cocción limitada por desnaturalización de la misma por el calor (Mahgoub y Elhag, 1998), ya que la actividad de la fitasa es muy sensible a la temperatura donde la temperatura óptima esta alrededor de 55°C (Frontela *et al.*, 2008).

3.4.3. El remojo.

Algunos procesos tecnológicos generalmente aplicados al maíz como remojo, tienen el efecto de reducir el contenido de ácido fítico. Liang *et al.*, en el 2008 encontraron que uno de los tratamientos más eficaces en la reducción es el remojo (42-59%), esta reducción de ácido fítico causada por inmersión en agua es debido a la solubilización de algunas sales de ácido fítico (Mahgoub y Elhag, 1998). En un estudio realizado por Hotz y Gibson en 2007 encontró que el procedimiento de remojo desarrollado para la alimentación en los grupos familiares rurales pueden reducir en un 50 % el fitato contenido en la harina de maíz, esta reducción de fitatos en el remojo puede contribuir a aumentar la biodisponibilidad de los minerales, en especial del zinc. Por otro lado, Lestienne *et al.*, 2005 encontró que el remojo puede reducir el fitato pero no garantiza la conservación de hierro en los cereales debido a la lixiviación de los iones de hierro en el medio de inmersión.

3.4.4. La germinación.

La germinación provoca una importante reducción del contenido de ácido fítico debida a la actividad de la enzima fitasa, que hidroliza el ácido fítico de fosfato inorgánico y el inositol (Mahgoub y Elhag, 1998). También, la alfa-amilasa puede desempeñar un papel en la

degradación del fitato durante la germinación del grano, como ya que aumenta la actividad de fitasa durante la germinación (Frontela *et al.*, 2008).

3.4.5. Los tratamientos enzimáticos.

El uso de la enzima fitasa se ha descrito como un medio eficaz de reducir el contenido de fitatos de los cereales (Hurrell, 2004), con la activación de la enzima fitasa endógena y/o la adición de fitasa microbiana (Fageer *et al.*, 2004), igualmente el uso de la alfa-amilasa como tratamiento industrial contribuye en reducción de ácido fítico de cereales (Frontela *et al.*, 2008). Las Fitases comerciales de origen microbiano son las más prometedoras para la producción de alimentos con bajo fitato y alta biodisponibilidad de nutriente (Palacios *et al.*, 2008), estas son procedentes de determinados microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces* o *Aspergillus*), que han sido aprobados en un gran número de países, y reconocidos por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) como seguro para el hombre permitiendo su uso como ingrediente en alimentos (Frontela *et al.*, 2008).

El maíz es uno de los cereales con menos actividad de la fitasa (12 U/kg), comparado con trigo el centeno que poseen valores (2078- 5453 U/kg) respectivamente, este parámetro se mide en unidades de fitasa y se define como la cantidad de fitasa que libera 1 μmol de fosfato inorgánico a partir de una disolución 1 mM de fitato de sodio por minuto a un pH de 5.5 y Temperatura de 37°C (Zimmermann *et al.*, 2002).

3.4.6. Los procesos Fermentativos.

La fermentación al mismo tiempo de prolongar la conservación, aumenta el valor nutritivo de los alimentos a través del mecanismo de reducir factores antinutritivos, como ácido fítico (Chelule *et al.*, 2010) (Eklund-Jonsson *et al.*, 2001), con la reducción del ácido fítico la fermentación provoca un incremento de solubilidad de minerales en los alimentos, mejorando la biodisponibilidad de los mismos en cereales y legumbres (Liang *et al.*, 2008). La fermentación puede inducir hidrólisis del fitato por la acción de enzimas microbianas fitasas, la cual hidroliza el fitato reduciendo los fosfatos del inositol, por ende la hidrólisis produce fosfatos del inositol menores de 5 (ejemplo, de IP 1 hasta IP4) que no poseen un efecto negativo en la absorción de minerales como zinc y el hierro (Hotz y Gibson 2007). La fermentación láctica al producir un descenso en el valor de pH como consecuencia de la producción bacteriana de ácidos, principalmente láctico, produce un ambiente óptimo para la activación de la fitasa endógena presente en los cereales, produciéndose de forma paralela la formación de compuestos solubles de Fe y ácidos

orgánicos (Bering. et al., 2006), la fermentación es el procedimiento más eficaz en la reducción de IP6 pero su aplicación sigue siendo limitada debido a la carga de trabajo adicional que implica y las características organolépticas particulares que inducen (Lestienne et al., 2005). Por otra parte, Marfo et al., 1990 encontró que un 72 h de fermentación disminuyó significativamente el contenido de fitatos en los productos alimenticios (Fageer et al., 2004), y provoca una disminución de ácido fítico (56-96%) según Mahgoub y Elhag, 1998.

3.4.7. El mejoramiento genético.

El desafío del alto contenido de fitatos en el maíz han sido abordados, modificando el contenido desde su origen con el mejoramiento de los cultivos y la bioingeniería, teniendo en cuenta los avances en materia de fitomejoramiento y genética, que han dado lugar a híbridos de maíz de bajo fitato (LPA) que contienen niveles reducidos de ácido fítico (Peter y Baker, 2002) y un aumento de los niveles de P disponible para los no rumiantes (Douglas *et al.*, 2000) (Peter y Baker, 2002), sin embargo es bien conocido que el desarrollo y la señalización de la planta depende del fitato lo que indica que bajos contenido de fósforo fítico se puede traducir bajo rendimiento y productividad (Raboy, 2009), sufriendo daño oxidativo, un contenido mayor en radicales libres y el envejecimiento acelerado como resultado del daño al ADN y una mayor carbonilación de proteínas de las semillas (Raboy, 2009). Un enfoque prometedor que puede evitar resultados no deseados por los impactos sobre el metabolismo del ácido fítico es expresar altos niveles de la enzima fitasa en las semillas obteniendo semillas de “alta-fitasa” (Raboy, 2009). Los estudios sobre la nutrición en humanos han documentado el aumento de la absorción fraccional de Fe, Zn y Ca de un 30% a un 50%, en sujetos que consumieron tipos de maíz de bajo fitato en comparación con los que consumieron del tipo normal (Mendoza *et al.*, 1998) un estudio encontró que la biodisponibilidad del fósforo en gluten obtenido de maíz bajo en fitato (LPA) fue el doble que el gluten obtenido con el maíz convencional (Peter y Baker, 2002).

Existen algunas complicaciones en la producción de los alimentos modificados genéticamente porque podrían ocurrir potencialmente resultados no deseados. Igualmente, la regulación en algunos países para la comercialización de productos transgénicos podría ser excesiva en su afán de proteger al público de los resultados inesperados de estas nuevas tecnologías, obstaculizando el progreso de las mismas (Raboy, 2009).

3.5. FERMENTACIÓN.

La fermentación es una de las más antiguas tecnologías utilizadas para la conservación de alimentos, en la actualidad, una gran variedad de productos alimenticios de la canasta familiar se derivan de esta tecnología y son elaborados tanto por las pequeñas industrias de alimentos, así como en las grandes empresas (Motarjemi *et al.*, 2002). Los inicios de la fermentación de los alimentos se remontan a los albores de la civilización, los primeros registros datan 6000 años A.C, probablemente se originó a partir de las interacciones microbianas de carácter aceptable en la fermentación de la leche, carnes y verduras (Caplice y Fitzgerald, 1999) (Holzapfel, 2002). Además, de ser uno de los métodos más antiguos de conservación de los alimentos, su importancia en la vida moderna no solo se destaca la conservación, sino también por sus muy apreciados atributos sensoriales y nutricionales (Holzapfel, 2002).

La definición de química de la fermentación tiene como principio la oxidación de carbohidratos (hidratos de carbono usados como fuente de energía por los microorganismos) para generación de productos finales que son generalmente ácidos, alcohol y/o dióxido de carbono (Caplice y Fitzgerald, 1999), los productos del proceso dependen generalmente si el proceso es aeróbico o anaeróbico (Caplice y Fitzgerald, 1999). La fermentación sólida se define como el proceso realizado en un material no soluble que actúa como soporte físico y fuente de nutrientes en ausencia de líquido (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2002), El bajo contenido de humedad significa que la fermentación sólo puede ser llevada a cabo por un número limitado de microorganismos, principalmente levaduras y hongos, aunque algunas bacterias se han adaptado muy bien en este tipo de fermentación (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2002)

La fermentación se ha hecho cada vez más importante y valorada en especial en los países en desarrollo, donde las viejas tradiciones son generalmente bien mantenidas (Holzapfel, 2002), Donde contribuye a la seguridad alimentaria, principalmente debido a su calidad de conservación en condiciones ambientales y a la mejora la calidad nutricional de los alimentos (Motarjemi *et al.*, 2002), a través la mejora la digestibilidad (Caplice y Fitzgerald, 1999). Aunque, el fracaso de los procesos de fermentación puede dar lugar al deterioro y/o la supervivencia de patógenos (Holzapfel, 2002).

La fermentación es importante nutricionalmente debido a su capacidad de aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes y el aumento como algunas vitaminas como en el caso de la fermentación del maíz (Chelule *et al.*, 2010), principalmente en países africanos, la

fermentación juega un papel importante en la nutrición de los lactantes y niños pequeños, ya que se utiliza para la preparación de alimentos complementarios (Motarjemi *et al.*, 2002).

3.5.1. Fermentación tradicional.

La fermentación aplicada tradicionalmente es un proceso espontáneo, es decir, elaborado sin el uso de un inóculo inicial, en general es el resultado de las actividades competitivas de una gran variedad de microorganismos contaminantes o presentes naturalmente, los mejores adaptados al sustrato son con el tiempo dominan el proceso (Holzapfel, 2002), En la elaboración de productos por esta fermentación las metodologías y el conocimiento fueron heredados de generación en generación, dentro de comunidades locales, monasterios y haciendas feudales, donde se produjeron cantidades relativamente pequeñas del producto que se distribuyó o alrededor del área inmediato (Caplice y Fitzgerald, 1999), la evolución de la fermentación de alimentos, en particular sus aplicaciones tradicionales, se han basado en la experiencia adquirida a través de ensayo y error por sucesivas generaciones de productores y familias que han utilizado la tecnología para la preparación y la preservación de los alimentos (Motarjemi *et al.*, 2002). Debido a las limitaciones en la infraestructura y las tecnologías de baja, las zonas rurales en la mayoría de los países en desarrollo no han sido capaces de mantenerse al corriente de los acontecimientos mundiales hacia la industrialización (Holzapfel, 2002).

Algunos de los alimentos tradicionalmente procesados en Colombia a partir del maíz son los arepas, tamales, hallacas, empanadas (Hammond y Jez, 2011), los productos tradicionales tamales y las empanadas son elaborados a partir de una masa de maíz amarillo que incluye en su procesamiento el aumento en la concentración de agua y es dejado en con alta humedad durante 2 a 3 días, en este periodo de tiempo debido a la carga de microbiana natural del maíz ocurre una fermentación espontanea en las masas dándole sabores ácidos característicos (Vanegas, 2009), la flora natural está presente en cantidades considerables en el maíz ya que en el almacenamiento del maíz en ensilaje favorece procesos enzimáticos y microbiológicos, debido a que el material es comprimido y compactado herméticamente, dando lugar a la anaerobiosis y a una fermentación natural láctica (Rasmussen *et al.*, 2011).

Las fermentaciones tradicionales poco controladas pueden verse afectadas por la actividad de hongos que producen micotoxinas que se consideran un riesgo para la salud humana y animal (Bata y Lásztity, 1999) (Rasmussen *et al.*, 2011), en la fermentación la

contaminación con hongos también ocurre naturalmente en alimentos a base de cereales como (maíz, cebada, sorgo, avena, arroz, centeno y trigo), y en legumbres. De hecho, en el maíz han encontrado hongos del géneros como el *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Byssoschlamys* y *Monascus* (Rasmussen *et al.*, 2011), estos hongos pueden producir muchos metabolitos secundarios inclusive las micotoxinas como los son aflatoxinas, fumosinas, entre otras, pudiendo llegar a tener efectos en la salud como carcinogénico, mutagénico, neurotóxico, hepatóxico e inmunosupresor (Rasmussen *et al.*, 2011), en estudios de toxicidad realizados a varios a diferentes híbridos de maíz fermentados naturalmente encontraron niveles de aflatoxinas y fumosinas por encima de los niveles permitidos en los alimentos en Estados Unidos (Abbas *et al.*, 2006) (Rasmussen *et al.*, 2011).

3.5.2. Fermentación acelerada con cultivos iniciadores.

La biotecnología moderna de los alimentos ha recorrido un largo camino desde los tiempos antiguos de la fermentación de alimentos empírica (Holzapfel, 2002), con este desarrollo se ha logrado establecer que para garantizar una buena preservación, eficiencia en tiempos de proceso, inocuidad y calidad de los productos debe hacerse una inoculación con un cultivo iniciador en las primeras fases del proceso (Holzapfel, 2002).

Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación o material que contiene un gran número de microorganismos, que puede ser añadido para acelerar un proceso de fermentación. Siendo adaptada al sustrato, es un arranque que facilita el control de un proceso de fermentación y la previsibilidad de sus productos (Holzapfel, 2002).

La incorporación de cultivos iniciadores o inóculos en el proceso fermentación tradicional o pequeña escala aplicados al maíz puede mejorar las condiciones de procesamiento y la calidad del producto a través de una rápida actividad metabólica acelerada (acidificación rápida), tiempo de producción más cortos, mejoramiento de los atributos sensoriales, mejora de la seguridad e higiene mediante la eliminación rápida de patógenos, reducción de riesgos toxicológicos y la degradación eficiente de los factores antinutricionales (Holzapfel, 2002). Como medio de cultivo se ha utilizado la harina de maíz, sobre todo para los microorganismos amilolíticos los cuales reportan altos crecimientos y una buena productividad en este medio (Altaf *et al.*, 2007) (Reddy *et al.*, 2008). El uso de bacterias amilolíticas de ácido láctico como un cultivo iniciador es muy común ya que produce amilasa y acidificación del medio (Calderon *et al.*, 2003).

El uso de cultivos iniciadores se ha usado para industrializar productos de maíz anteriormente obtenidos de una fermentación tradicional como el *togwa* mejorando de su aceptabilidad, la estabilidad microbiológica y la seguridad higiénica (Mugula *et al.*, 2003), y en una producción industrialmente harina deshidratada de *kenkey* (Nche *et al.*, 2010).

Debido a que algunas cepas de BAL asociadas con los alimentos fermentados, son capaces de degradar los factores antinutricionales, como el ácido fítico y compuestos fenólicos (Motarjemi *et al.*, 2002), la incorporación de BAL en cultivos iniciadores puros pueden mejorar el valor nutritivo de los alimentos con la incremento de la digestibilidad y biodisponibilidad de micronutrientes, y contribuir más específicamente con el enriquecimiento biológico a través de la biosíntesis de vitaminas y aminoácidos esenciales (Holzapfel, 2002). La inoculación con cultivos iniciadores no ofrece en sí mismas una garantía absoluta de seguridad en los procesos de fermentación, ni elimina los riesgos para la salud asociados a los patógenos, como componentes tóxicos, debido a que el proceso de la fermentación debe ser apoyada por la conservación de los principios básicos de Buenas Prácticas de manufactura (BPM) (Holzapfel, 2002).

3.6. BATERIAS ÁCIDO LACTICAS.

Las bacterias de ácido láctico (BAL) son un grupo numeroso de bacterias beneficiosas que tienen propiedades similares y ácido láctico como un producto final del proceso de fermentación (Konings *et al.*, 2000), fueron descubiertas por científico sueco C.W. Scheele en 1780 en leche cortada (Reddy *et al.*, 2008), aunque se han usado para fermentar alimentos hace al menos 4000 años. La BAL comprenden aproximadamente 20 géneros como lo son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Reddy *et al.*, 2008), donde el *Lactobacillus* es más grande de este género, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas (Reddy *et al.*, 2008). Estos microbios son ampliamente usados en la producción de productos alimenticios fermentados, como yogur (el spp. de *Streptococcus* y *Lactobacillus* Spp.), Los quesos (*Lactococcus* Spp.), La col fermentada (*Leuconostoc* spp.) y productos embutidos. El *Lactobacillus* spp. es las bacterias probióticas principalmente usadas para fermentar el maíz (Holzapfel, 2002) (Caplice y Fitzgerald, 1999).

La BAL son Gram positivas, no producen esporas, crecen en fermentación anaeróbica, y se aplican tradicionalmente en la conservación de una variedad de alimentos (De Vries *et al.*, 2006) (Reddy *et al.*, 2008), algunos pueden ser cocos o bacilos y son acidotolerantes

(Reddy *et al.*, 2008), La conversión en ácido láctico a través fermentación de los azúcares presentes en las materias primas es su función principal, aunque posee otras propiedades importantes como son la producción de péptidos antimicrobianos y exopolisacáridos (De Vries *et al.*, 2006), también son el grupo bacteriano al cual pertenecen la mayoría de cultivos probióticos, que convierten azúcares fermentables en ácido láctico, etanol y otros metabolitos, bajando el pH del medio y creando condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Helland *et al.*, 2004). La mayoría de especies de BAL tienen requisitos múltiples de aminoácidos y vitaminas, por esta razón son generalmente muy abundantes en alimentos tradicionales de comunidades donde estos requisitos pueden ser provistos (Reddy *et al.*, 2008).

Las bacterias lácticas pueden ser homofermentativas produciendo ácido láctico como producto principal a partir de la glucosa, fermentando a 1 mol de glucosa para producción de 2 moles de ácido láctico, o pueden ser heterofermentativas donde 50% del producto es ácido láctico, fermentando un 1 mol de glucosa para la producción de 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂ (Reddy *et al.*, 2008). El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos más importantes producidos por ácido láctico las bacterias (BAL), el ácido láctico es quiral, por lo que se pueden encontrar dos (isómeros ópticos), el L (+) láctico y la D (-) láctico, donde los niveles elevados de ácido láctico D (-) producen daños en la salud humana, el ácido láctico L (+) es el isómero preferido en alimentos y las industrias farmacéuticas (Reddy *et al.*, 2008). El pH por acción del ácido láctico en la fermentación puede caer hasta 4.0, pudiendo inhibir el crecimiento de la mayoría de otros microorganismos incluyendo los agentes patógenos, permitiéndole estas durabilidad en los alimentos (Reddy *et al.*, 2008).

Las bacterias del ácido láctico han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la industria de los alimentos fermentados, debido a su actividad metabólica de las proteínas, azúcares y lípidos, contribuyendo así a la digestibilidad y conservación de alimentos, así como la mejora de la textura y el perfil sensorial de la final producto (Pescuma *et al.*, 2008). En muchos casos, los lactobacilos también se utilizan como cultivos iniciadores en la fermentación de los alimentos industriales y artesanales, ya que contribuyen a la conservación, el sabor y la textura de los alimentos fermentados (De Vries *et al.*, 2006), una ventaja significativa es su adecuación al sustrato pudiendo usar materias primas baratas como desperdicio del suero de leche, de melaza, de almidón,

remolacha, azúcar de caña y otros materiales con contenido altos en carbohidratos (Reddy *et al.*, 2008).

Las BAL han sido aisladas de productos amiláceos tropicales como alimentos fermentados, preparados principalmente de yuca y cereales (por ejemplo., El maíz y el sorgo). Las cepas de *Lactobacillus Plantarum* han sido aisladas alimentos africanos basado en yucas fermentadas (Reddy *et al.*, 2008), especies como el *Lactobacillus manihotivorans* se ha aislado de yuca en fermentaciones agrias de almidón en Colombia (Reddy *et al.*, 2008). Ampliamente se han realizado aislación e identificación de cepas de bacterias del ácido láctico y las levaduras en preparaciones de maíz fermentadas tradicionalmente, muchas especies de *Lactobacillus* fueron aisladas de todos los tipos de *togwa*, en todas las etapas de proceso, donde *L. plantarum* dominó en las etapas finales de fermentación con una alta actividad amilolítica (Mugula *et al.*, 2003), también se han identificado bacterias lácticas en productos tradicionales de maíz en diferentes regiones del mundo como *Kenkey* en Ghana, *Mahewu* en Sur África, *Ogi* en Nigeria (Hammond y Jez, 2011), en masas fermentadas en el sur occidente colombiano (Vanegas, 2009).

Hay numerosas áreas aplicativas para el uso de bacterias de ácido láctico ambos en industria y salud humana, incluyendo preservación de alimentos (Cebeci y Gurakan, 2003), el conocimiento detallado de una serie de rasgos fisiológicos ha abierto nuevas aplicaciones potenciales para estos organismos en la industria de alimentos, mientras que otros rasgos pueden ser beneficiosos para la salud humana. (Konings *et al.*, 2000). Por ejemplo, las cepas de varias especies *Lactobacillus* han demostrado ejercer un rango de salud promoviendo actividades, como la resistencia en contra de agentes patógenos y reducción de niveles de colesterol de sangre, aparte de ser usadas como probióticos (De Vries *et al.*, 2006), al ser ingerido como un organismo viviente en ciertas cantidades (10^7 - 10^9 UFC/día) (Cebeci y Gurakan 2003), debido a que la funcionabilidad de probióticos, es considerada tan al menos 10^8 - 10^9 bacterias vivas deberían alcanzar el intestino delgado diariamente (Helland *et al.*, 2004), las bacterias lácticas son reconocidas por la producción de bacteriocinas (es decir antibióticos peptídicos que son principalmente letal para otras cepas y especies de bacterias) (Konings *et al.*, 2000), además la BAL producen varios compuestos antimicrobianos, incluyendo ácidos orgánicos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas; el ácido fenilactico es producido también por cepas de BAL el cual tiene actividad antimicrobiana y de inhibición de patógenos (Valerio *et al.*, 2008) (Motarjemi *et al.*, 2002). Además de mejorar los niveles de proteínas y aminoácidos, las

cepas específicas de BAL han sido sugeridas para quitar contaminantes del mutagénicos, incluyendo a micotoxinas, en alimentos y piensos (Chelule *et al.*, 2010) (Adams y Nicolaidis, 1997). Los efectos beneficiosos de la fermentación láctica en la degradación de factores antinutritivos han sido demostradas debido a que la mayoría de BAL aisladas de los diferentes alimentos fermentados ha tenido actividad de la fosfatasa con actividad en contra de fitato (Reddy *et al.*, 2008) (Holzapfel, 2002) (Motarjemi *et al.*, 2002).

3.6.1. *Lactobacillus plantarum*.

La *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) es una de las especies más importantes bacterias del ácido láctico (BAL) usada en la elaboración de productos fermentados (Cebeci y Gurakan 2003), es una bacteria mesófila generalmente amilolítica (Mugula *et al.*, 2003). Igualmente, es una bacteria facultativa y puede utilizar oxígeno para el crecimiento de la célula y para el metabolismo del producto (Fu y Mathews 1999), es un miembro del grupo de facultativos heterofermentativos (Zago *et al.*, 2011), es acidofila, su tolerancia ácida ha estado bien documentada (Calderon *et al.*, 2003), pues el *L. plantarum* mantiene una gradiente interna pH (4.6-4.8) hasta un pH externo de 3.0 (Fu y Mathews 1999).

La *L. plantarum* tiene el potencial para asociarse con muchas superficies diferentes sustratos y potencial de crecimiento (De Vries *et al.*, 2006), ha sido identificada como el organismo dominante al final de varias fermentaciones naturales de ácido láctico (Mugula *et al.*, 2003), las cepas de *L. plantarum* aisladas de fermentaciones de maíz y de yuca fueron consideradas amilolíticas debido a capacidad de poder hidrolizar almidón. (Mugula *et al.*, 2003) (Reddy *et al.*, 2008). La *L. plantarum* es a menudo utilizada como un cultivo iniciador en la elaboración comercial de productos fermentados como encurtidos, embutidos, vegetales y ensilajes (Fu y Mathews, 1999). La *Lactobacillus plantarum* es una versátil bacteria ácido láctica con capacidad para sobrevivir el tránsito gástrico, y pueden colonizar el tracto intestinal de los mamíferos humanos y otros. En varios estudios se describen los efectos de *L. plantarum* de consumo en la fisiología humana (De Vries *et al.*, 2006) (Zago *et al.*, 2011), debido a su adherencia a células gastrointestinales dándole características probióticas (Cebeci y Gurakan 2003), tanto así que una gran variedad de cepas de *L. plantarum* son actualmente comercializados como probióticos (De Vries *et al.*, 2006). También, se ha demostrado su efecto en la reducción de glucósidos cianogénicos minimizando efectos tóxicos en la yuca (Holzapfel, 2002), Asimismo, algunas cepas de *L. plantarum*, son capaces de degradar el ácido fítico (Holzapfel, 1997) (Holzapfel, 2002).

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Materia prima maíz.

La cantidad de unidad experimental fue un kilogramo de cada variedad de maíz integral, el maíz QPM (maíz con alta calidad proteica) fue proporcionado por el CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical) y Maíz integral (Variedad Valle) fue provisto por una industria de masas fermentadas tradicionales del Sur Occidente Colombiano.

4.1.2. Material biológico bacteria ácido láctica.

La bacteria ácido láctica (BAL) usada en la fermentación, fue una cepa *Lactobacillus plantarum* aislada de maíz fermentado, proporcionada por el Cepario del Laboratorio de Microbiología Marina de la Universidad del Valle, rotulada como C31, identificada como una cepa amilolítica, GRAM (+), mesófilas, anaerobia facultativa, homofermentativa y productora del isómero de ácido láctico L(+) y observada en el microscopio a 100X como un bacilo corto. La cepa de BAL (*L. plantarum* C31) criopreservada fue activada sembrándola en el medio de cultivo MRS estéril (Tabla 1.), se verificó la pureza con pruebas colorimétricas de GRAM. Además, se confirmó su actividad amilolítica en medio MRS almidón (Tabla 2.) y vapores de yodo bisublimado (Giraud, 1992), posteriormente se utilizaron dos métodos de conservación de cepas, en medio solido de agar MRS (Tabla 1.) en tubo inclinado a 5°C y por crioconservación adicionándole al medio liquido MRS 30% de glicerol como sustancia criopreservante almacenándola temperaturas a -20°C.

4.1.3. Medios de cultivo.

Tabla 1. Composición de medio de cultivo MRS, Merck®.

Componente.	g/L.
Peptona proteica	10
Extracto de Carne	8
Extracto de levadura	4
D(+) Glucosa	20
Acetato de sodio	5
Citrato de triamonio	2
Sulfato de magnesio.	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dibasico de potasio	2
Polysorbato 80	1

Tabla 2. Composición de medio de cultivo Agar Almidón.

Componente.	g/L.
Peptona proteica	10
Extracto de Carne	8
Extracto de levadura	4
Almidón	20
Acetato de sodio	5
Sulfato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dibásico de potasio	2
Polysorbato 80	1
Agar	20

Fuente: Autores

Tabla 3. Composición de medio de cultivo PDA, Merk®.

Componente.	g/L.
D (+) Glucosa	20
Agar	15
Infusión de patata (200 g de patata)	4

Tabla 4. Composición de medio de cultivo VRB, Merk®.

Componente.	g/L.
Peptona de gelatina	7
Extracto de levadura	3
Cloruro sódico	5
Mezcla de Sales biliares	1,5
(D+) Glucosa	10
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002
Agar	15

Tabla 5. Composición de medio de cultivo de harina de maíz.

Componente	g
Harina de Maíz	50
Agua destilada	1000

Fuente: Altaf *et al.*, 2007

4.2. METODOLOGIA.

4.2.1. Molienda y preparación de las muestras.

Se realizó un proceso de molienda seca a las muestras de maíz integral en un molino forrajero (Trapp TRF 300®) previamente desinfectado y se pasó por un molino de laboratorio (Cyclone Sample Mill®), garantizando que toda la harina pasara por un tamiz de 50 mesh, ya que este tamaño de malla permitió obtener masas similares a las tradicionales. Se verificó que la humedad de la harina integral de maíz, determinada por secado en estufa de según el procedimiento 925.10 de la AOAC, 1990, cumpliera la norma del CODEX, 1995. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a 5 °C en bolsas herméticas a vacío.

4.2.2. Elaboración de medio para inóculo.

Para cada variedad de maíz se preparó un medio con se realizó un medio líquido con una mezcla de harina de maíz y agua destilada con una relación 5g/100ml (Tabla 5.) Posteriormente, se esterilizó la mezcla a una presión de 15 kg/cm³ y una temperatura de 120°C durante 15 minutos.

4.2.3. Cinética de crecimiento del inóculo de maíz.

Se sembró la cepa pura de *L.plantarum* en un medio líquido de MRS en una relación de 1:10 por 24 horas, pasado este tiempo fue adicionada al medio de harina de maíz estéril, se incubó a 35°C con agitación de 120 rpm (Ramírez, 2005). Con el fin de verificar la evolución del crecimiento microbiano en el inóculo de maíz Cada tres horas se tomó 1mL del mismo y se diluyó convenientemente en agua peptonada, se determinó la biomasa producida mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de las BAL en placa MRS-azul de anilina (Ramírez, 2005) y se determinó el pH con un pHmetro (Thermo Scientific®), y se establecieron cálculos del seguimiento de la cinética como:

- Tasa de crecimiento volumétrico (dx/dt):

$$\frac{dX}{dt} \quad (1).$$

- Tasa o velocidad específica del crecimiento (μ):

$$\mu = \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (2).$$

- Tiempo de duplicación celular (t_d):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (3).$$

4.2.4. Elaboración de las masas fermentadas de maíz.

Se elaboraron masas maíz con una relación entre el volumen del inóculo y la masa de harina de maíz de 0,89 (mL/g), homogenizando los componentes durante 15 minutos con una mezcladora escala laboratorio con aspas estériles, siguiendo las recomendaciones para el mezclado de componentes Pruebas de mezclado. Mc Cabe 1991. Posteriormente se colocaron 130 g de la masa en contenedores plásticos estériles sellados herméticamente favoreciendo la anaerobiosis. Para realizar la fermentación tradicional se siguió el mismo procedimiento de elaboración de masas con la diferencia no se adicionó un inóculo fermentado sino un medio estéril de harina de maíz, sin adición de microorganismo. Las masas elaboradas fueron incubadas en durante 24, 36, 48 horas a 35°C.

4.2.5. Evolución del proceso de fermentación de las masas fermentadas.

4.2.5.1. Determinaciones microbiológicas.

- **Bacterias lácticas.**

Esta técnica de conteo en placa informa sobre el número de células viables en términos de UFC/mL de sustrato fermentado, fue diluido un mililitro de muestra en agua peptonada, efectuando diluciones decimales, cada dilución fue transferida 0.1 mL de muestra en agar MRS (Tabla 1.), con 0,3% de azul de anilina, dispersándolo en la superficie de este con perlas de vidrio estériles, las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 horas, considerando en el conteo solamente las placas con un crecimiento de 30 a 300 colonias (Ramírez, 2005).

- **Hongos y levaduras.**

Se diluyó un mililitro de muestra en agua peptonada, efectuando diluciones decimales, cada dilución fue transferida 0.1 mL de muestra en agar PDA (Tabla 3.), dispersándose en la superficie con perlas de vidrio estériles, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 horas.

- **Coliformes Totales.**

Se diluyó un mililitro de muestra en agua peptonada, efectuando diluciones decimales, cada dilución fue transferida 0.1 mL de muestra en agar VRB (Tabla 4.), dispersándose en la superficie con perlas de vidrio estériles, las placas fueron incubadas a temperatura 35°C durante 48 horas.

4.2.5.2. Determinaciones fisicoquímicas.

- **pH.**

Se diluyó 1 gramo de muestra en 10 mL de agua destilada, siguiendo el método 44-19 de la AACC, 2000 para determinar el pH de la muestra, el cual se cuantificó con un pHmetro (Thermo Scientific®).

- **Azúcares Totales.**

Se realizó por el método Antrona (Dubois *et al.*, 1956) usado en fermentaciones por (Calderon *et al.*, 2003) (Ramírez, 2005), en el cual se diluyó la muestra convenientemente, ajustándola a un volumen de 2,5 mL., posteriormente se ubicó la muestra sobre baño de hielo y se le agregó 5 mL. de solución de antrona en ácido sulfúrico 96% (200 mg.:100 mL.), inmediatamente se colocó en ebullición durante 10 min., se enfrió y se leyó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro (MILTON ROY SPECTRONIC 401), esta lectura se comparó con una curva estándar realizada anteriormente en disoluciones con concentraciones de 0 hasta 50 mg/L de glucosa anhidrida (Fig. A2).

- **Azúcares reductores.**

Se realizó por el método DNS (Miller, 1959) usado en fermentaciones por (Calderón *et al.*, 2003) en donde se diluyó la muestra convenientemente ajustándola a un volumen de 1,0 mL., posteriormente en una cabina extractora se adicionó 1,0 mL. del reactivo DNS (2,0 g ácido 3,5 Dinitrosalicílico, 0,1 g sulfito de sodio anhidrido, 2,0 g hidróxido sodio, 0,4 g de fenol ajustada a 200 mL. con agua destilada) en baño de hielo, inmediatamente se colocó

en ebullición por 5 min., se enfrió y se adicionó 8 mL. de agua destilada, se leyó la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro (MILTON ROY SPECTRONIC 401), esta lectura se comparó con una curva estándar de azúcares reductores (Fig. A3) la cual se realizó en disoluciones con concentraciones de 0 hasta 1 g/L de con glucosa anhidra.

- **Proteínas solubles.**

Se realizó por el método de Lowry *et al*, 1951, en donde se diluyó la muestra convenientemente y se ajustó a 1,0 mL. Luego, se adicionó 0,9 mL. de solución A (0,5 g de tartrato de sodio y potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 mL. de hidróxido de sodio 1N, 125 mL de agua destilada), se llevó por 10 minutos a baño maría a 50 °C, después se adicionó sobre baño de hielo 0,1 mL. de la solución B (2,0 g de tartrato de sodio y potasio, 1,0 g sulfato de cobre , 10 mL. de NaOH, 90 mL. de agua destilada) se colocó 10 minutos en la oscuridad, inmediatamente se adicionó 3 mL. de la solución C (reactivo de folin en agua destilada con una relación de 1: 14), se llevó a baño maría 50°C durante 10 min, se enfrió y leyó la absorbancia a 750 nm. en un espectrofotómetro (MILTON ROY SPECTRONIC 401), esta lectura se comparó con la curva estándar de proteínas solubles (Fig. A4) hecho anteriormente en disoluciones con concentraciones de 0 hasta 300mg/L de seroalbumina.

- **Cenizas.**

Las cenizas son los residuos inorgánicos de una muestra incinerada, se determinó con el propósito de analizar el contenido mineral y definir la cantidad de materia orgánica, para la determinación de las cenizas según el procedimiento 923.03 de las AOAC, 1990 se tomó un gramo de muestra, el cual se colocó en un crisol en estufa hasta que no hubo generación de humos y se pasó a colocar en una mufla a 550°C, hasta que se obtuvo cenizas blancas, las cuales fueron el contenido de cenizas en la muestra.

- **Humedad.**

El método usado en la determinación de humedad fue el secado en estufa, según el procedimiento 925.10 de las AOAC, 1990, el cual se tomó 5 g de muestra, la cual fue pesada, y posteriormente colocada en un estufa a 105°C hasta que llegó a peso constante. La pérdida de peso se tomó como la humedad de la muestra.

4.2.6. Determinación de Fósforo fítico o fitato.

El método usado para la determinación fue basado en relaciones encontradas entre el contenido del fósforo total y el fitato por Raboy, 2009. El cual demostró que fitato representa el 75% del fósforo total de la semilla de maíz. La relación entre P total y P fítico también fue encontrada por Sandoval, 2005, para el frijol común. La determinación del fitato partiendo desde el fósforo total fue realizada por Cárdenas, 2006 para encontrar la remoción del fitato por proceso de ultrafiltración a el agua del cocimiento del maíz, llamando al valor obtenido de la multiplicación del porcentaje teórico por el contenido de fósforo total, fósforo fítico.

4.2.6.1. Determinación de Fósforo Total.

Procedimiento seguido según la norma 479 de la NTC, 1993, Donde, se calcinaron 2 g de muestras por 4 h a 600 °C se enfriaron y se adicionaron 40cm³ de HCL y acido nítrico HNO₃, posteriormente fue llevado a ebullición. Después se enfrió y se transfirió a un matraz aforado de 20 cm³., se filtró y se colocó una alícuota con contuvo 0.5- 1.5 mg. de fósforo en un matraz aforado de 100 cm³. Luego, se adicionó 20 cm³ de reactivo molibdovanadato, para luego medir la absorbancia 400 nm.

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño del experimentos para la evaluación de la reducción de fósforo fítico en masas fermentadas de maíz, fue un diseño factorial general $2^2 \times 3$ con dos repeticiones por tratamiento (*duplicado*) donde hubo tres factores del diseño, el primero es el variedad de maíz, con dos niveles que corresponden a la variedad Valle (S) usado en la producción de masas fermentadas de maíz en el Suroccidente Colombiano y la variedad QPM (Q) proveniente de los laboratorios del CIAT, el segundo factor es el tipo de fermentación con dos niveles, que correspondieron a la fermentación láctica acelerada(C) que fue el proceso en el cual se adicionó un inóculo con alta concentración de *L. plantarum* C31 en medio harina de maíz , el segundo nivel de este factor, fue el tipo de proceso que se asemeja a la fermentación tradicional (S) del Suroccidente Colombiano sin incorporación de ningún inóculo fermentado. El último factor del experimento es el tiempo de fermentación con tres niveles que fueron 24, 36, 48 horas. Las respuestas del experimento fueron el contenido de ácido fítico y la reducción del mismo, en base al contenido inicial del componente en las masas de maíz. El resumen del diseño se mostró en la (Tabla 6.).

Los datos obtenidos de las diferentes corridas del experimento se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) para encontrar los factores que provocaron diferencias significativas tanto en las variables de respuesta, posteriormente se le realizó la prueba Tukey ($p < 0,05$), con el fin de establecer la diferencia mínima significativa entre las medias. El análisis estadístico de los datos se llevaron a cabo utilizando un paquete de software estadístico (Statistical Software Minitap 15).

Tabla 6. Resumen del diseño de experimental.

Factores	Niveles	Variables de respuesta
Variedad de maíz.	M.	% Reducción de fósforo fítico. % Contenido de fósforo fítico.
	Q.	
Tipo de fermentación.	C.	
	S.	
Tiempo de fermentación.	24.	
	36.	
	48.	

- **Forma del modelo para el contenido de fósforo fítico:**

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \gamma_k + (\tau\alpha)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\alpha\gamma)_{jk} + (\tau\alpha\gamma)_{ijk} + e_{ijkl} \quad (4).$$

- **Forma del modelo para la reducción de de fósforo fítico:**

$$\nabla Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \gamma_k + (\tau\alpha)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\alpha\gamma)_{jk} + (\tau\alpha\gamma)_{ijk} + e_{ijkl} \quad (5).$$

$$\nabla Y_{ijkl} = \frac{Y_i - Y_{ijkl}}{Y_i} \quad (6).$$

Para: $i = 1, 2$; $j = 1, 2$; $k = 1, 2, 3$; $l = 1, 2$.

Donde:

Y_i = Porcentaje inicial de fósforo fítico en el i-ésima variedad de maíz.

Y_{ijkl} = Porcentaje de fósforo fítico de la mezcla con el i-ésima variedad de maíz, el j-ésimo tipo de fermentación, el k-ésimo tiempo de fermentación, la l-ésima replica.

∇Y_{ijkl} = Porcentaje de la reducción de fósforo fítico inicial del i-ésima variedad de maíz, al aplicarle el tratamiento con el j-ésimo tipo de fermentación, el k-ésimo tiempo de fermentación, la l-ésima replica.

μ = La media global del porcentaje de fósforo fítico en la mezcla, para todos los factores y todas las réplicas.

τ_i = Efecto producido por la i-ésima variedad de maíz sobre el porcentaje de fósforo fítico.

α_j = Efecto producido por el j-ésimo tipo de fermentación sobre el porcentaje de fósforo fítico.

γ_k = Efecto producido por el k-ésimo tiempo de fermentación sobre el porcentaje de fósforo fítico.

$(\tau\alpha)_{ij}$ = Efecto producido por la interacción de la i-ésima variedad de maíz, con el j-ésimo tipo de fermentación, sobre el porcentaje de fósforo. La interpretación es análoga para las demás interacciones dobles.

$(\tau\alpha\gamma)_{ijk}$ = Efecto producido por la interacción de la i-ésima V el j-ésimo tipo de fermentación y el k-ésimo tiempo de fermentación, sobre el porcentaje de fósforo fítico.

e_{ijkl} = Error aleatorio no controlable o no controlado.

La hipótesis nula (H_0) se cumplió, si todas las medias de los tratamientos fueron iguales entre los diferentes niveles de los factores y/o sus respectivas interacciones. La hipótesis alterna (H_a) se cumplió si al menos una de las medias de los tratamientos es diferentes a los demás en algún nivel de sus factores y/o sus respectivas interacciones. El criterio o regla de decisión del análisis de varianza ANOVA estuvo descrita por la condición que $F_0 > F_{teorica (2,12)}$ con ($p < 0,05$). Entonces, existe un efecto significativo del tratamiento y/o la interacción entre los tratamientos considerados sobre la variable de respuesta.

- **Cálculos de intervalos Tukey:**

$$T_\alpha = q_{\alpha(f,p)} \sqrt{\frac{CM_E}{n}} \quad (7).$$

$q_{\alpha(f,p)}$: Valor crítico de la distribución del rango estudentizado donde α es nivel de significancia, f son los grados de libertad del error y p son el número de tratamientos.

CM_E : Cuadrado medio del error.

n : Número de repeticiones.

$|Y_{i...} - Y_{.j..}| > T_\alpha$: Comparación de intervalos Tukey en la cual si o solo si esta afirmaciones verdadera existe diferencia significativa entre los tratamientos.

5. RESULTADOS.

5.1. CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA MAÍZ.

El contenido de humedad del maíz variedad Valle fue 12,77% p/p y el maíz QPM fue 12,37 % p/p, lo que cumple con la norma técnica de calidad CODEX, 1995 para la harina de maíz, en la cual se establece como requisito de calidad que la harina integral debe tener una humedad máxima de 15% p/p.

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA (*L. plantarum* C31).

La Cepa láctica *Lactobacillus plantarum* C31 fue una cepa GRAM positiva, vista en el microscopia a 100X como un bacilo corto (Figura 2a.), su colonia se desarrolla en forma redondeada y colorea azul brillante en un medio MRS con azul de anilina (Figura 2b.). Además, fue una bacteria amilolítica debido a que al ser sembrada en medio agar almidón (Figura 2a.) (Tabla 2.) Reveló un consumo alrededor de la colonia de BAL sembrada, ya que este no colorea azul en presencia de vapores de yodo (Figura 2b)

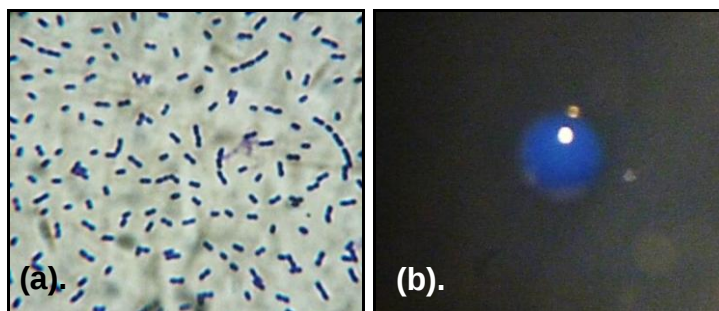


Figura 2. Imagen de la cepa *Lactobacillus plantarum* C31. (a). vista a 100X después del procedimiento GRAM; (b). Colonia en medio MRS azul de anilina vista en estereoscopio.

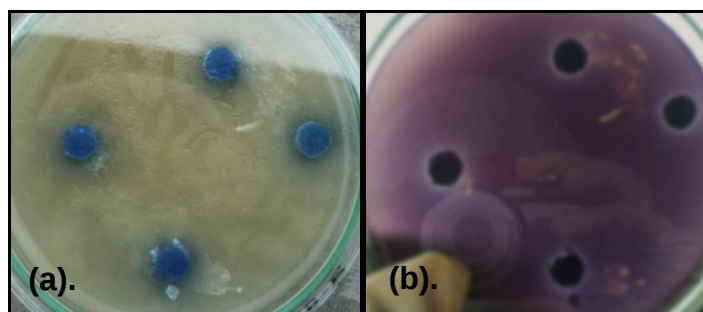


Figura 3. Imagen de la prueba amilolítica de la BAL, *Lactobacillus plantarum* C31 en MRS almidón. (a). antes de ser expuesta a vapores de yodo; (b). Después de ser expuesta a vapores de yodo, formando el alo alrededor de los aros con crecimiento de la BAL.

5.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PH DEL INÓCULO BAL (*L. plantarum* C31) EN MEDIO DE HARINA DE MAÍZ.

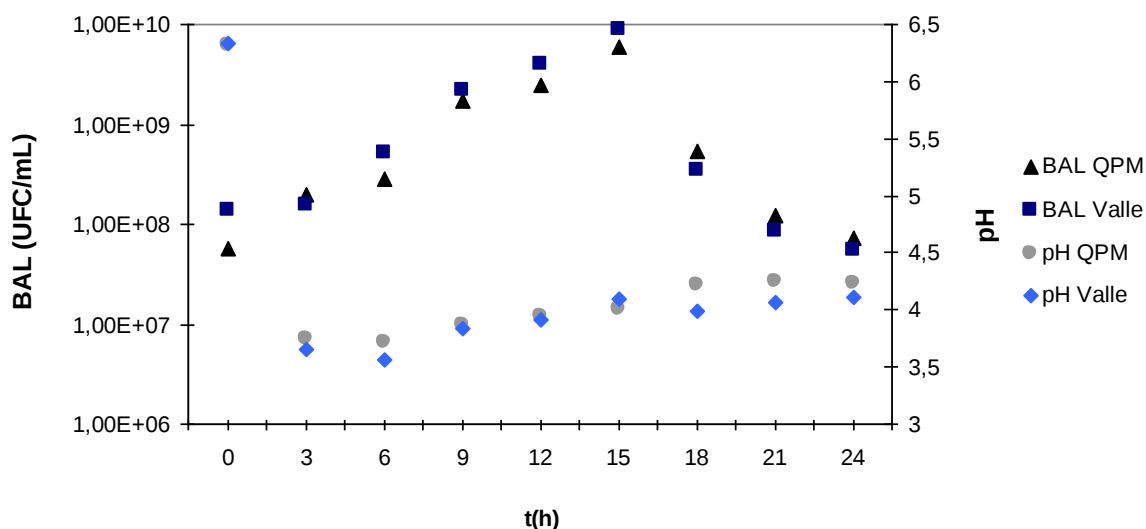


Figura 4. Cinética del inóculo de *L. plantarum* C31 del crecimiento de BAL y del pH del para inóculos realizados con una concentración 5 g./100 mL. de harina de dos variedades de maíz QPM y Valle.

Tabla 7. Tasa de crecimiento volumétrico (dx/dt) y la tasa específica de crecimiento (μ) para al cinética de crecimiento de *L. plantarum* C31 en los inóculos realizados con harina de maíz de las variedades QPM y Valle.

Intervalo de tiempo	dx/dt (UFC/mLh)		μ (h ⁻¹)	
	QPM	Valle	QPM	Valle
0-3	4,73E+07	6,17E+06	0,42	0,04
3-6	2,72E+07	1,19E+08	0,11	0,39
6-9	4,90E+08	5,60E+08	0,61	0,48
9-12	2,33E+08	6,02E+08	0,11	0,20
1 a 2-15	1,18E+09	1,65E+09	0,30	0,27
15-18	-1,82E+09	-2,87E+09	-0,81	-1,09
18-21	-1,38E+08	-8,48E+07	-0,50	-0,46
21-24	-1,58E+07	-1,00E+07	-0,17	-0,14

La cinética de crecimiento del *L. plantarum* C31 fue similar para las diferentes variedades de harina y se caracterizó por tener un crecimiento positivo desde el inicio de la fermentación hasta las 15 h (Fig. 4.), este periodo de tiempo se definió como su fase de crecimiento exponencial, y al promediar su tasa crecimiento hasta las 15 h dio como resultado $3,96 \times 10^8$ UFC/mLh para QPM y $5,87 \times 10^8$ UFC/mLh. para variedad Valle (Tabla

7.) y alcanzó su la tasa específica de crecimiento máxima (μ) entre las 6 y las 9 horas de crecimiento para ambas variedades (Tabla 7.), con un tiempo de duplicación (t_d) de 1,14 1,43 horas para las variedades QPM y Valle respectivamente. El intervalo comprendido de la 0 hasta 3 horas en la cinética del maíz para la variedad Valle fue un periodo de acondicionamiento al sustrato o retraso, representado por una tasa específica de crecimiento cerna a cero, (μ) igual 0.04 h^{-1} (Tabla 7.). En las 15 horas de crecimiento se alcanzó un máximo de 10^9 UFC/mL ., después de este tiempo comenzó a decrecer rápidamente hasta las 24 h experimentando su fase de muerte evidenciado con dx/dt y μ en valores negativos, en valores negativos (Tabla 7.).

La concentración de harina de maíz usada para la elaboración del inóculo mantiene un crecimiento adecuado superior 10^7 UFC/mL en todos los tiempos de la cinética y la cepa usada de *L. plantarum* tiene un tiempo de máximo crecimiento de fermentación de 15 h para los dos inóculos realizados con las variedades de maíz QPM y Valle. Estos resultados son similares a los encontrados por estudios anteriores como el realizado por Helland *et al.*, 2004, en donde se preparó un inóculo con una concentración aun mayor de harina de maíz y con la incorporación de otros aditivos, obteniendo un tiempo de máximo crecimiento a las 12 horas y el realizado por Calderón *et al.*, 2003 que recomendó un tiempo de precultivo de 12 horas para bacterias aisladas de masas de maíz tradicionales como el *Ogi*.

Después de las 15 horas hay una disminución de las UFC de las BAL que se relacionó con el valor del pH de estos tiempos ya que alcanzan un valor superior a 4.0 y según Calderón *et al.*, 2003 cuando el medio alcanza este pH, la actividad amilolítica de la bacteria disminuye, debido a que la α -amilasa se inactiva, y esta enzima es la que permitió a las BAL amilolíticas hidrolizar la fuente de carbono (almidón) del medio.

La concentración de harina de maíz en agua destilada estéril (5g/100mL) usada en la elaboración del inóculo fue la ideal, debido a que el crecimiento a las 15 horas fue óptimo y mayor a 10^9 UFC , Además este comportamiento fue mejor que el encontrado por Altaf *et al.*, 2007, donde se fermentó con una bacteria láctica amilolítica en una concentración de 5% de harina de maíz (medio que cuenta con contenido de almidón al 3,7% como fuente de carbono y enriquecido extracto de levadura) donde se encontró que tiempo de fermentación ideal era 3 días, basados además en la eficiencia en la producción de ácido láctico.

En las primeras tres horas de fermentación para ambos inóculos se presentó un descenso rápido en el pH como lo muestra la figura 4., continuando su reducción hasta llegar a una disminución máxima del pH transcurridas las 6 horas de crecimiento, alcanzando un valor de 3,72 para el inóculo realizado con harina variedad QPM y de 3,56 para el de harina tipo Valle. La *L. plantarum* del inóculo es acidotolerante y soporta pH entre 3,5 y 4,0 (Cebeci y Gurakan 2003), por esta razón cuando la cepa empleada experimentó pH ácidos menores a 4.0 continuo creciendo exponencialmente (Figura 4.), los valores bajos de pH fueron debidos a la producción de ácidos orgánicos de la BAL empleada, donde la mayor proporción de estos ácidos correspondió al ácido láctico (Reddy *et al.*, 2008). En la Figura 4. para los diferentes inóculos estudiados, después de las 6 horas de fermentación comienza a evidenciar un aumento paulatino del pH fluctuando en un rango muy pequeño, llegando después de las 15 horas a pH superiores 4,0. En estudios realizados en masas de maíz se encontró que cuando el pH es de 4,0 la producción de células de BAL es máxima (Fig. 4.) y para pH mayores decrece, así mismo lo hace la actividad de enzimas amilolíticas (Calderón *et al.*, 2003), porque al llegar al pH de 4,0, aunque se encuentra en la producción máxima de amilasa, en este punto se presenta la proteólisis de la misma (Calderon *et al.*, 2003). Analizando los factores que intervinieron en el crecimiento de la cepa de *L. plantarum* en el inóculo de maíz, se determinó como tiempo de crecimiento del inóculo las 12 horas, donde este experimentó un crecimiento ($\text{UFC/mL} > 10^9$; $\text{pH} < 4,0$) y debido a que en este tiempo de proceso para ambas variedades de maíz, se obtienen el máximo de crecimiento sin que el pH supere el valor de 4,0, y se garantiza una población de bacterias lácticas mayor a 10^7 , ya que las altas poblaciones iniciales de bacterias garantizan un desarrollo adecuado de la fermentación con un cultivo iniciador (Holzapfel, 2002).

El uso inóculos como cultivos iniciadores de la fermentación, son importantes para la industrialización de productos de maíz fermentados tradicionalmente (Mugula *et al.*, 2003) (Talon *et al.*, 2007). Aunque, los cultivos iniciadores deben ser específicos para cada producto, ya que la cepa inoculada en el caso de la materia prima maíz debe ser amilolítica y tener la propiedad de acidificar el medio para controlar la proliferación de patógenos (Calderón *et al.*, 2003), como fue el caso de la BAL usada *L. plantarum* C31, que fue amilolítica, propiedad que se verificó a través de una prueba en agar almidón, en la cual la BAL al estar expuesta a vapores de yodo produjo un halo alrededor de la colonia (Fig. 3), indicando el consumo del almidón.

5.4. EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y EL PH DE LAS MASAS FERMENTADAS DE HARINA DE MAÍZ.

5.4.1. Crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL).

En el proceso de fermentación acelerada MC y QC observó un crecimiento inicial alto de BAL (Fig. 5.), comparados con los reportados en las combinaciones en las fermentaciones tradicionales (QS y MS). Específicamente, los tratamientos con fermentación acelerada comenzaron con una población de BAL de 10^9 UFC/mL para la variedad de maíz Valle (MC) y de 10^{10} UFC/mL para la variedad de maíz QPM (QC), esta concentración inicial alta de BAL, fue debida a la adición en el tiempo inicial del inóculo de harina de maíz con un crecimiento de BAL de 12 horas.

Del análisis del parámetro de fermentación tasa de crecimiento volumétrico dx/dt (Tabla 8.), cuando las masas fueron sometidas a una fermentación tradicional (MS y QS), su crecimiento fue positivo en todos los intervalos de tiempo, obteniendo un máximo en último intervalo de 36 a 48 h. Cuando las masas experimentaron el proceso acelerado (MC y QC), el primer intervalo de tiempo de 0 a 24 h se caracterizó por un crecimiento positivo, a diferencia de los intervalos posteriores donde por ser negativa su tasa de crecimiento volumétrico se consideró como un comportamiento decreciente, aunque su crecimiento no llegó a valores inferiores a 10^9 UFC/mLh (Fig. 5.), mostrando que la alta concentración permanece constante durante las fermentaciones aceleradas para ambas variedades de maíz (MC y QC), con tasas específicas de crecimiento (μ) cercanas a cero (Tabla 9.). Excepcionalmente, el intervalo de las primeras 24 horas donde se obtuvo un máximo crecimiento para QC el cual fue mayor a 10^{10} UFC/mL y una (μ) de $0,59 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 9.), con un tiempo de duplicación (t_d) de 1,18 horas. El comportamiento en los tratamientos con fermentación tradicional (MS y QS) se diferenciaron ya que empiezan con una población baja de BAL de 10^4 UFC/mL para (MS) y de 10^3 UFC/mL para (QS), esta población a través del tiempo aumenta hasta llegar a las 48 horas de proceso con concentraciones superiores a 10^9 UFC/mL, las BAL en este tipo de fermentación se deben a la flora presente naturalmente en el maíz (Rasmussen *et al.*, 2011).

En la figura 6a y la figura 6c se observaron colonias que crecieron en las fermentaciones aceleradas (MC y QC), las cuales mostraron pureza en la uniformidad morfológica de las colonias (Fig. 6a y 6c) y las células, verificada por medio de la coloración GRAM donde todos los microorganismos fueron GRAM (+) (Fig. 7a). En cambio, en la fermentación tradicional (MS y QS), se observó la presencia de varios tipos de mesófilos ya que

algunas colonias se colorearon de azul de anilina (BAL) y otras no presentaron esta coloración en presencia del azul de anilina del medio (Fig. 6b y 6d), lo anterior mostró la impureza de los mesófilos que se presentan en la fermentaciones tradicionales, la cual se verificó haciendo una coloración GRAM de las colonias evidenciando presencia de algunos microorganismos GRAM (-) (Fig. 7b), dado algunos patógenos son GRAM negativos, esta contaminación podría efectuar un riesgo para la salud (Holzapfel, 2002). La pureza de los microorganismos en la fermentación acelerada fue debida alta concentración de BAL (*L. plantarum*), dada por inóculo puro adicionado en el inicio del proceso, y el crecimiento de la *L. plantarum* en un pH inferior a (4,0), le otorgó la ventaja de crecer sobre las bacterias mesófilas de flora natural del maíz (Fu y Mathews 1999), también el descenso del pH producido por las BAL inhibió los patógenos contaminantes (Helland *et al.*, 2004).

Las fermentaciones aceleradas presentaron inicialmente una concentración alta de BAL por la adición del inóculo, cual se mantuvo estable durante este tipo de fermentación para ambos tipos de maíces (MC y QC) y llega rápidamente a valores de acidificación, teniendo en cuenta estos dos aspectos el tiempo de fermentación se reduce de 48 horas en la fermentación tradicional a 24 horas en la fermentación acelerada (Fig. 5.), debido a que cuando se realizó de forma tradicional, solo hasta el final de la fermentación se obtuvieron las mayores concentraciones de BAL, esta reducción en el tiempo de fermentación fue reportada en otro estudio, en donde se realizó una inoculación con cultivos iniciadores puros para una fermentación acelerada en la producción de *kenkey*, en la cual el tiempo de proceso se redujo de 6 días a 24 horas, respecto al proceso tradicional aplicado a la harina de maíz (Nche *et al.*, 2010). La concentración obtenida de BAL en el inicio del proceso tradicional de fermentación dada por la flora natural de BAL (MS y QS), también fue encontrada por Sefa-Dedeh *et al.*, 2003 donde la presencia de estos microorganismos en la etapas iniciales estuvieron en concentraciones del orden de 10^2 UFC/mL; otros autores reportan la presencia natural de bacteria lácticas en las fermentaciones del maíz de las cuales se han aislado diferentes cepas de BAL; por ejemplo, muchas especies de *Lactobacillus* fueron aisladas de productos fermentados tradicionalmente en las etapas de crecimiento, siendo el *L. plantarum* dominante en las etapas finales de fermentación (Mugula *et al.*, 2003). Lo anteriormente mencionado, explica los diferentes tipos de colonias de BAL encontrados en el recuento de placa de BAL en las fermentaciones tradicionales con los diferentes variedades de maíz (Fig. 6b y

6d), donde se evidenció en la misma placa la presencia de microorganismos mesófilos no coloreados con el azul de anilina.

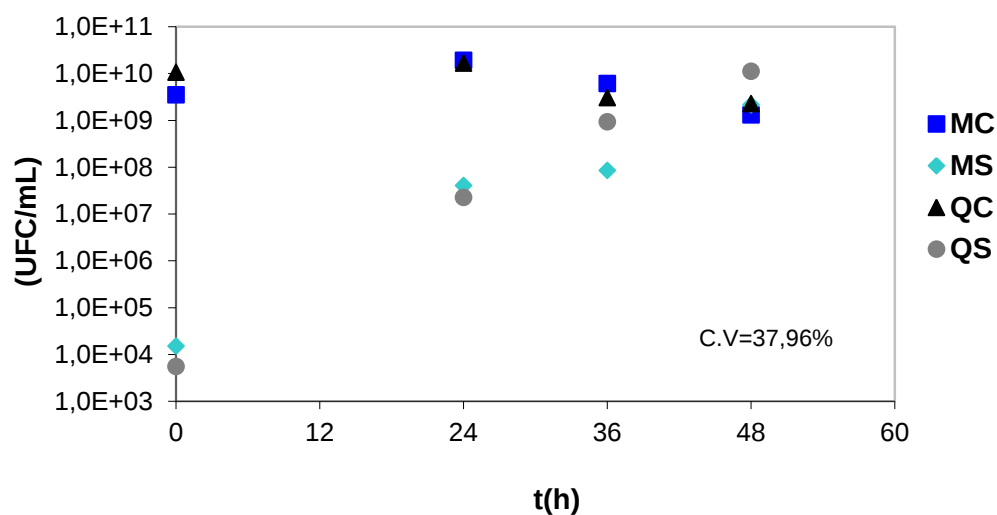


Figura 5. Crecimiento de BAL en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y maíz variedad Valle o común (M).

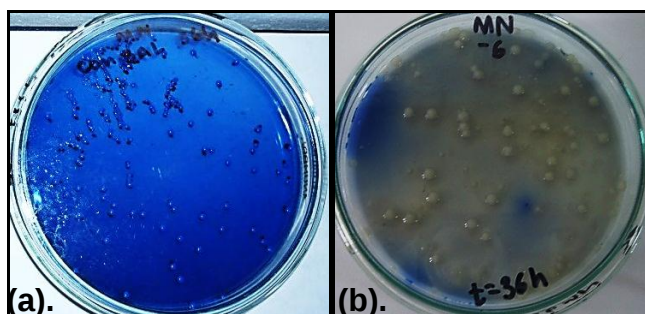


Figura 6.

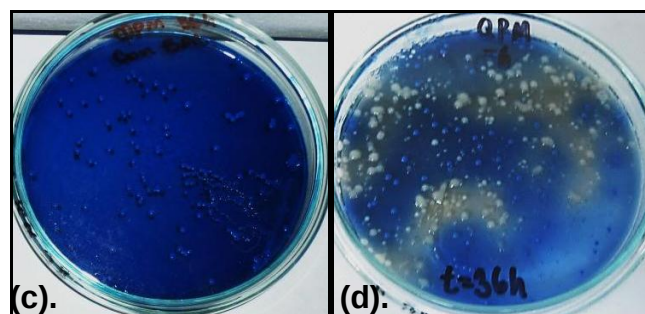


Figura 1. Imagen del crecimiento de BAL y/o mesófilos en placa en medio MRS con azul de anilina en el tiempo de fermentación 36 h. (a). MC, variedad de maíz Valle, y fermentación acelerada ; (b). MS, variedad maíz Valle y tipo de fermentación tradicional; (c). QC, variedad de maíz QPM y fermentación acelerada ; (d). QS, variedad maíz QPM y fermentación tradicional.

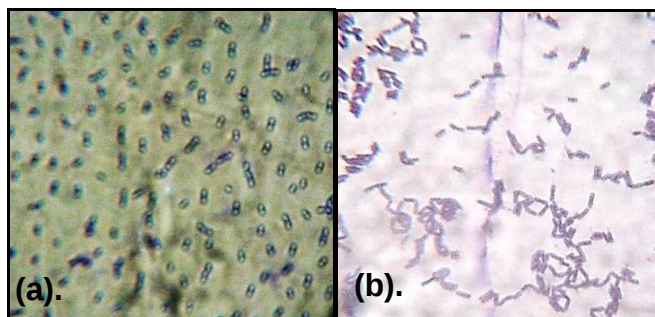


Figura 7. Imagen microscópica de las coloraciones Gram realizadas a colonias en las fermentaciones, vistas a 100X. (a). Fermentación acelerada (C); (b). Fermentación tradicional (S).

Tabla 8. Tasa de crecimiento (dx/dt) para los diferentes intervalos de tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Miaz variedad Valle (M).

Intervalo de tiempo (h)	Tasa de crecimiento (dx/dt) UFC/mL.h			
	MC	MS	QC	QS
0-24	6,50E+08	1,69E+06	2,50E+08	9,37E+05
24-36	-1,08E+09	3,71E+06	-1,13E+09	7,52E+07
36-48	-3,99E+08	1,72E+08	-6,63E+07	8,44E+08

Table 9. Tasa o velocidad específica de crecimiento (μ) para los diferentes intervalos de tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Miaz variedad Valle (M).

Intervalo de tiempo (h)	μ (h ⁻¹)			
	MC	MS	QC	QS
0-24	0,589	0,329	0,019	0,347
24-36	-0,095	0,062	-0,141	0,310
36-48	-0,128	0,269	-0,025	0,207

5.4.2. Determinación del pH.

El pH inicial fue menor para los tratamientos con fermentación acelerada (MC y QC), que para los tratamientos que experimentaron la fermentación tradicional (MS y QS), debido a que inicialmente cantidad de BAL fue mayor (Fig. 8.), ya que las cantidad de BAL del inóculo fue mayor a 10^9 UFC/mL. y el pH fue inferior a 4.0 (Fig.8.). El pH descendió rápidamente para la fermentación acelerada (MC y QC), estabilizándose para el tiempo 36

y 48 horas alrededor de 3.7. En cambio, cuando la fermentación fue tradicional (MS y QS), el comportamiento del pH en el tiempo de fermentación varió según la variedad de maíz, para la variedad Valle (M) el pH tuvo un comportamiento similar a la fermentación acelerada con un descenso rápido y una estabilización en los tiempos finales (24, 36 y 48 horas); pero cuando el tipo de maíz fue QPM, el pH mostró una fluctuación leve permaneciendo muy cercano al valor inicial 6,0, con un mínimo a las 36 horas de 5,13 (Fig.8.). El descenso de pH experimentado por la combinación de factores MC, QC y MS se debió a la alta producción de ácidos orgánicos de BAL, dado que son un grupo bacteriano que convierten los azúcares fermentables en ácido láctico disminuyendo el pH y creando condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Helland *et al.*, 2004), la disminución del pH especialmente en las fermentaciones acelerada (MC y QC), fue producto de la inoculación con altas concentraciones de *L. plantarum*, debido a que algunos estudios señalan que *L. plantarum* mantiene un gradiente interno pH (4.6-4.8) hasta un pH externo de 3.0 a pesar del acidulante (Fu y Mathews, 1999) (McDonald *et al.*, 1990), la *L. plantarum* siendo acidotolerante y produciendo en mayor proporción ácido láctico por su carácter homofermentativo, ya que puede producir ácido láctico a partir de sustratos de carbohidratos como almidón en una relación de 0,82g/g (Reddy *et al.*, 2008) (Giraud *et al.*, 1994). Además, fue revelador el hecho de que en la fermentación tradicional producto de las BAL presentes naturalmente en el maíz Valle (MS), también produjera una cantidad de ácidos orgánicos similar a la fermentación acelerada, traducido en un evidente el descenso del pH a través del proceso. Las BAL presentes en el maíz normal pueden llegar ser de la misma especie o cepa, tener los mismos metabolitos de las BAL presentes en la fermentación acelerada (*L. plantarum* C31), debido a que este microorganismo usado en la fermentación acelerada fue aislado de masas ácidas de maíz tradicionales del sur occidente colombiano. Además, la *L. plantarum* ha sido identificada como el organismo dominante en el final de varias fermentaciones naturales ácido lácticas del maíz (Mugula *et al.*, 2003) (Kunene *et al.*, 2000), y este comportamiento de pH fue encontrado Sefa-Dedeh *et al.*, 2003 cuando el maíz no tenía ningún procedimiento diferente a la fermentación dada por la flora natural donde el pH inicial fue de 6.68 y a las 48 horas había descendido a 3,62.

La figura 8, mostró que el comportamiento que el pH para QS fue superior a 4,0, más cercano a valores poco ácidos de pH (5,2 – 6,0), en todos los tiempos de fermentación, lo que indica el producto principal de la fermentación provocada por la flora natural maíz

QPM, no fueron los ácidos orgánicos, y sugirió la presencia de microorganismos diferentes a las BAL como otras bacterias, hongos y levaduras (Fig.9a. y 9b.), que pudieron producir otros metabolitos como etanol, haciendo el medio no tan ácido (Reddy *et al.*, 2008).

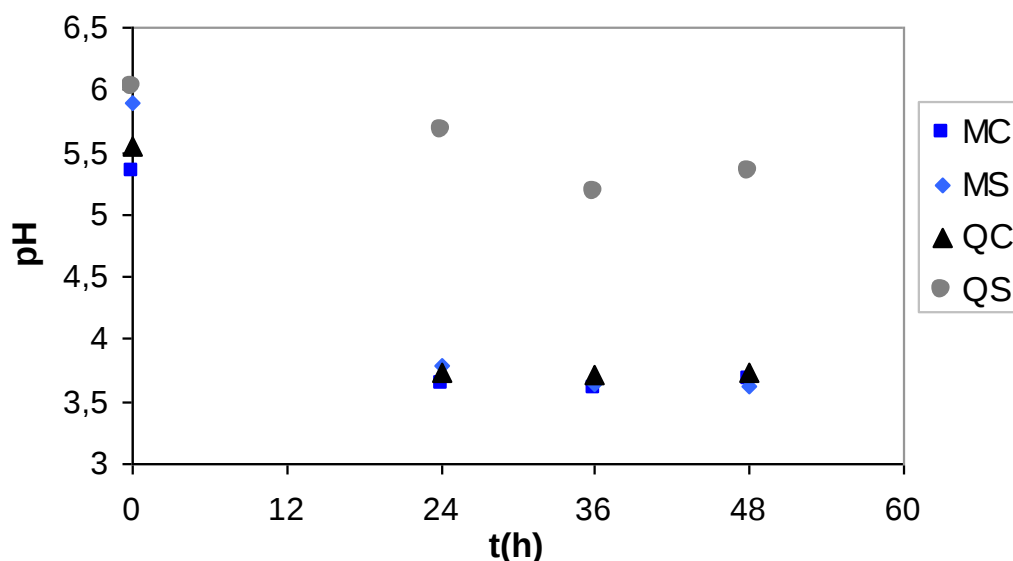


Figura 8. pH en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle o común (M).

5.4.3. Crecimiento de hongos y levaduras.

En la tabla 10. se mostró en el conteo de hongos y levaduras, donde inicialmente para el maíz Valle (M) fue de 10^3 UFC/mL y para el maíz QPM (Q) fue de 10^4 UFC/mL., en el desarrollo de los diferentes tipos de fermentaciones se notó que la fermentación láctica acelerada desde el primeras 24 horas, inhibió el crecimiento de hongos y levaduras para los dos variedades de maíz (Tabla 10.), ya que con la fermentación tradicional que para el variedad de maíz Valle los hongos y las levaduras permanecieron 10^3 UFC/mL hasta las 24 h, y en el maíz QPM permanecieron hasta las 36 horas con un conteo de superior 10^4 UFC/mL, consecuentemente cuando el tipo de fermentación fue acelerada para ambas variedades de maíz (MC y QC) desde las 24 horas hasta el final de la fermentación no se presentó crecimiento de hongos, debido al crecimiento de la *L. plantarum* ya que esta produce un compuesto proteico antifúngico que inhiben el crecimiento de hongos y levaduras (De Muyncka *et al.*, 2004), y según resultados obtenidos por De Muyncka *et al.*, 2004 la *L. plantarum* también presentó inhibición de hongos a las 48 y 72 horas de fermentación, asimismo esta acción antifungica fue debida a su metabolito principal el ácido láctico (Helland *et al.*, 2004). La fermentación tradicional al comenzar con bajas

concentración de BAL permitió un crecimiento de hongos y levaduras, lo que indicó que este tipo de fermentación no presentó resultados satisfactorios en la inhibición de hongos en las primeras etapas de la fermentación (Tabla 10.). Además, los hongos y levaduras pueden producir muchos metabolitos secundarios inclusive micotoxinas como aflatoxinas y fumosinas (Rasmussen *et al.*, 2011), presentando un riesgo para la salud en humanos (Bata y Lásztity 1999). Asimismo, el inicio de una fermentación espontánea toma un tiempo relativamente largo (24-48 h) (Holzapfel, 2002), con un alto riesgo de fracaso y durante esta primera fase de retardo microbiano y produjo la contaminación de microorganismos como los hongos y/o patógenos presente en materias primas, utensilios y/o en el medio ambiente, la aumentó lentamente en número y competió por los nutrientes produciendo metabolitos ya mencionados como micotoxinas, esta fase inicial de crecimiento lento de las BAL se puede reducir mediante la inoculación y uso de cultivos iniciadores (Holzapfel, 2002). Aunque, al realizar el conteo de coliformes y/o enterobacterias dio negativos para todos los casos, es decir para todos los tiempos de proceso, para cada tipo de fermentaciones en las distintas variedades de maíz, es decir que el proceso se tuvo en cuenta las buenas prácticas de manufactura y unos buenos procesos de limpieza y desinfección (Holzapfel, 2002).

Table 10. Crecimiento de hongos y levaduras en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelareda (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle o común (M).

t(h)	UFC/mL.			
	MC	MS	QC	QS
0	1,05E+03	2,85E+03	1,70E+04	1,20E+04
24	Ausencia	6,00E+03	Ausencia	4,50E+03
36	Ausencia	Ausencia	Ausencia	2,20E+04
48	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia



Figura 9. Imagen del crecimiento de Hongos y levaduras en el tiempo de 24 horas de fermentación para: (a). MS, variedad de maíz Valle y fermentación tradicional; (b). QS, variedad de maíz QPM y tipo de fermentación tradicional; (c) QC variedad de maíz QPM y la fermentación acelerada.



Figura 10. Imagen de la prueba de enterobacterias y/o coliformes, realizadas en los diferentes tiempos de proceso, en las fermentaciones tradicional y acelerada en masas elaboradas a partir masas de harina de maíz de la variedad QPM y Valle.

5.5.EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS EN LAS MASAS FERMENTADAS DE MAÍZ.

5.5.1. Contenido de Azúcares totales y reductores.

En la figura 11 y 12, el contenido inicial de azúcar total y azúcar reductores fue mayor en las masas elaboradas con maíz QPM, que en las masas constituidas de maíz variedad Valle. Para las fermentaciones acelerada y tradicional en la variedad de maíz QPM (QC y QS) experimentaron una reducción de azúcares totales alcanzando un mínimo a las 48 horas de 11,74 g/100mL para QC y de 18,89 g/100mL para QS, la reducción de estos azúcares totales tiene relación directa con el comportamiento de los azúcares reductores para QC y QS, debido a que comportaron de forma similar al experimentar el proceso de la fermentación (Fig.11 y 12). En cambio, en las masas fermentadas de la variedad Valle (MC y MS), el contenido tanto de azúcares totales como de reductores fue diferente para cada tipo de fermentación, ya que cuando la fermentación fue tradicional (MS) el

contenido de azúcar total como de reductores aumento a medida que transcurría la fermentación, obteniendo valores mayores a las 48 horas de la misma. A diferencia, de la fermentación acelerada con la variedad Valle (MC), donde en las primeras 24 horas aumentó su contenido de carbohidratos totales y reductores, para luego comenzar a disminuir hasta llegar al valor mínimo a las 48 horas de 17,36 g/100mL para los azúcares totales, y 4,05 g/ 100mL para los reductores (Fig. 11 y 12).

La reducción de carbohidratos es común en procesos de fermentación debido a que las microorganismos necesitan una fuente de carbono como su energía, para la producción de sus metabolitos. El conocimiento de la cinética del azúcar contribuyó a una mejor comprensión de la formación de crecimiento de la célula y del producto (Charalampopoulou *et al.*, 2009), además el maíz es una fuente rica de carbohidratos especialmente en almidón (Naqvi *et al.*, 2011) siendo un materia prima utilizada para la elaboración de productos fermentados. La fermentación acelerada del maíz (MC y QC) redujo más carbohidratos, comparado con la fermentación tradicional (MS y QS), esta reducción de carbohidratos fue debida a que la BAL inoculada en la fermentación acelerada, permaneció en altas concentraciones durante toda la fermentación y la *L. plantarum* inoculada por ser una BAL amilolítica que a pH inferiores a 4.0, su enzima α -amilasa posee actividad favoreciendo la rápida hidrólisis del almidón durante la fermentación (Calderon *et al.*, 2003), a diferencia de la fermentación tradicional donde hubo presencia natural de microorganismos en cantidades inferiores en el inicio del proceso lo permitió una reducción del contenido de carbohidratos menor. Cuando se fermentó tradicionalmente la variedad de Valle (QS) esta mostró un aumento en el contenido de carbohidratos, el cual se pudo explicar por la acción de la amilasa producida por la flora natural de maíz entre ellos hongos y levaduras, BAL, y demás mesófilos (Fig 6d y 9b), que combinado con el descenso del pH produjeron la hidrólisis de carbohidratos complejos como el almidón, originando la presencia de gran cantidad de moléculas de azúcares menos complejas como dextrinas, acumulándose ya que no fueron usados por los microorganismos en desarrollo, lo que se demostró por las bajas poblaciones en las etapas iniciales en la fermentación tradicional (MS y QS) en relación en la fermentación acelerada (MC y QC) (Fig. 5.) ya que cepas de *L. plantarum* aisladas de fermentaciones tradicionales de maíz como el *togwa* demostraron hidrolizar también el almidón (Mugula *et al.*, 2003) (Giraud *et al.*, 1994).

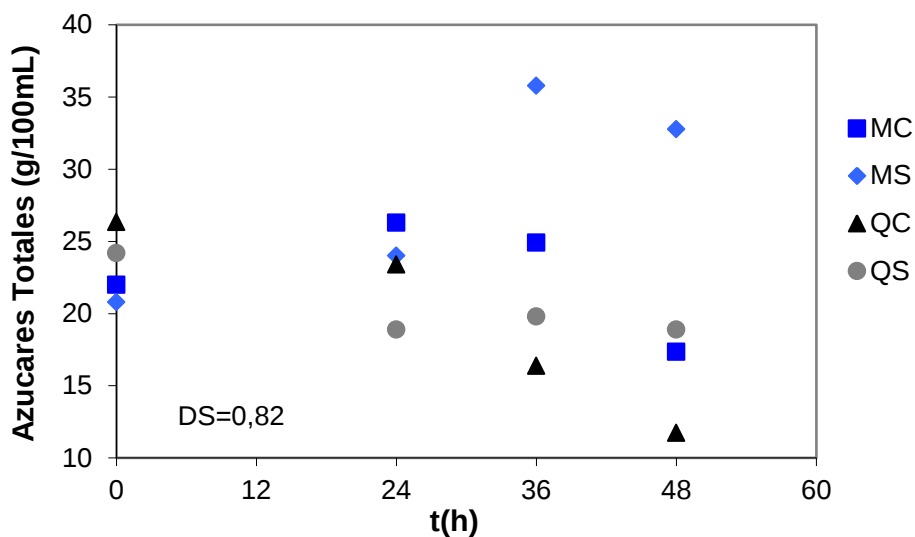


Figura 11. Concentración de azúcares totales en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle o común (M).

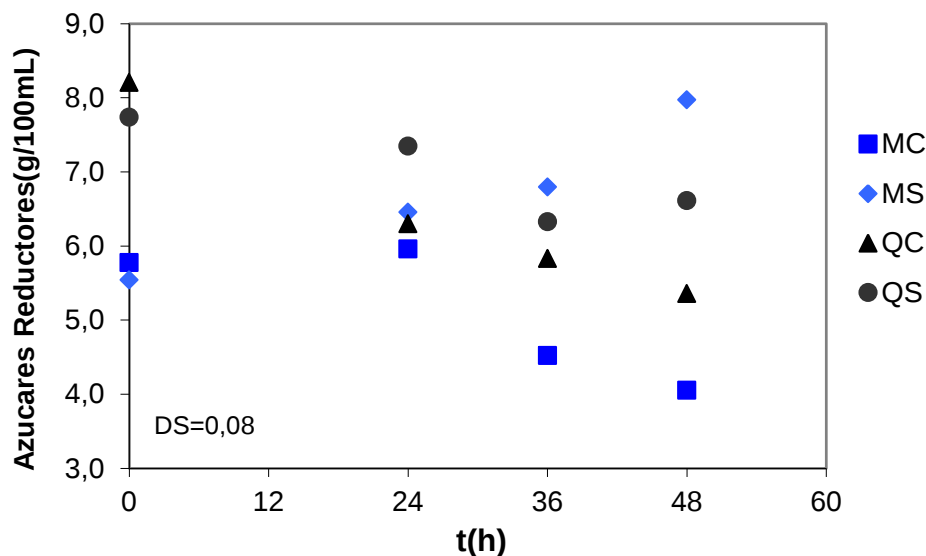


Figura 12. Concentración de azúcares reductores en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M)

5.5.2. Contenido de proteínas solubles.

El contenido inicial de proteínas en la masas de maíz fue mayor para el variedad de maíz QPM que estuvieron entre 6,0 g/100mL para QC y 7,1 g/100mL para QS, comparados con los obtenidos para la variedad Valle que estuvieron entre 4,2 y 4,9 g/100mL para MC y MS respectivamente. La figura 13 mostró que el contenido de proteínas solubles en el

primer intervalo de fermentación experimentó un comportamiento diferente para cada combinación de los niveles en los factores (variedad de maíz*tipo de fermentación), ya que en (MC y MS) el contenido aumentó, en QC disminuyó rápidamente y en QS permaneció constante. Después de 24 horas de proceso cuando se fermentó tradicionalmente (MS y QS) el contenido de proteínas solubles en las masas comenzó a disminuir, alcanzando los valores inferiores en el final de la fermentación. En cambio, el comportamiento de las proteínas solubles después de las 24 h en las fermentaciones aceleradas (MC y QC), se consideró constante debido a que las fluctuaciones presentadas no fueron tan significativas, comparadas con las presentadas por la fermentación tradicional (MS y QS) para los mismos intervalos de tiempo.

El maíz QPM contiene un contenido proteico más alto que la variedad Valle debido a que esta variedad es rica en aminoácidos esenciales como la lisina y triptófano (Fageer *et al.*, 2004) (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2006), en cambio el maíz común contiene bajo contenido y es de poca calidad (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004).

El aumento del contenido proteico en algunos intervalos tiempo se atribuyó a diferentes fenómenos relacionados con cambios en la cantidad de proteínas en los procesos de fermentación. Algunos de los comportamientos experimentados en la fermentación que se pudieron atribuir al aumento en el contenido proteico fueron la producción de enzimas como la amilasas, proteasas, lipasas y fitasas por parte de los microorganismos, que modifican las materias primas de la fermentación a través de la hidrólisis de polisacáridos, proteínas, fitatos y lípidos, respectivamente (Chelule *et al.*, 2010), el aumento de la proteínas pueden reflejar un incremento en biomasa (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004), la producción compuestos proteicos antifúngicos por parte de las BAL (De Muyncka *et al.*, 2004), el aumento de aminoácidos esenciales como lisina y triptófano por medio de la actividad de las proteasas y fitasas estas últimas reducen antinutrientes que se unen a las proteínas del maíz mejorando su biodisponibilidad (Chelule *et al.*, 2010). Por otra parte, el descenso del contenido proteico en algunos intervalos de tiempo se atribuyó a que paralelamente a los procesos de aumento de proteínas, se dan en la fermentación otros que indican que el contenido de proteínas solubles disminuye como la desnaturalización de proteínas debido a cambios en el pH en la fermentación láctica, los cuales también pudieron reducir la actividad de las enzimas (Chelule *et al.*, 2010), el consumo de proteínas para producción sus metabolitos. Debido a los comportamiento de las proteínas en la fermentación se puede atribuir fenómenos complejos y diferentes, el

comportamiento general de las mismas en el proceso ha sido un punto de poco consenso y discusión varias investigaciones (Chelule *et al.*, 2010) (Gilliland, 1990).

Cuando el maíz Valle experimentó los dos tipos de fermentación (MS y MC) en las primeras 24 horas de proceso, su contenido proteínas solubles aumentó, ya que tiene un bajo contenido de proteínas solubles inicial y el microorganismo para su crecimiento adquirió como de fuente de nitrógeno, proteínas más complejas hidrolizándolas en aminoácidos más simples, los cuales se acumularon en etapas iniciales de la fermentación, este comportamiento también fue encontrado por Yousif y El Tinay, 2000 donde en las primeras etapas de fermentación la fracción de zeína en el maíz disminuyó drásticamente, pero el contenido de glutelina aumentó, este aumento de proteínas solubles está relacionado a la reducción de antinutrientes debido a que la fermentación aumenta el valor nutritivo de los alimentos en especial con su aumento en aminoácidos esenciales y a la biodisponibilidad de los minerales (Holzapfel, 2002) (Chelule *et al.*, 2010). la explicación para la reducción de proteínas solubles en QC en el primer intervalo de tiempo, ya que a diferencia del maíz Valle, el QPM tiene un contenido inicial alto de proteínas solubles, también es debido a que el cambio tan rápido de pH en la fermentación acelerada (Fig. 8.), puede desnaturalizar muchas proteínas haciéndolas insolubles (Chelule *et al.*, 2010). En las primeras 24 horas de fermentación en QS el contenido de proteínas solubles permaneció constante y se relacionó con la estabilidad en el pH para esta combinación de niveles de los factores (QS) (Fig. 8.), lo que indicó que los microorganismos presentes en la flora natural del maíz QPM (levaduras, hongos, mesófilos y BAL (Fig. 6d y 9b), se encontraban en la fase de acondicionamiento al sustrato proteico (Holzapfel, 2002). Después de 24 horas en la fermentación tradicional (MS y QS), el contenido de proteínas solubles disminuyó hasta el final del proceso, tal comportamiento fue debido a que la microflora presente naturalmente en el maíz fue proteolítica y consumió como fuente de nitrógeno la proteína soluble del medio para sus procesos metabólicos.

La caída de proteínas solubles en la fermentación acelerada cuando el sustrato fue harina QPM en los primeros tiempos y su comportamiento estables en los últimos tiempos de proceso, contrastó con los resultados encontrados por Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004 en la fermentación sólida, en la cual se desarrolló un producto tipo *tempe* de harina de maíz QPM, reportando un aumento en su contenido proteico al final de la fermentación, tal diferencia entre la investigaciones fue debida principalmente a que los microorganismos

usados fueron diferentes, ya que Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004 usaron hongos para el proceso de inoculación y fermentación acelerada.

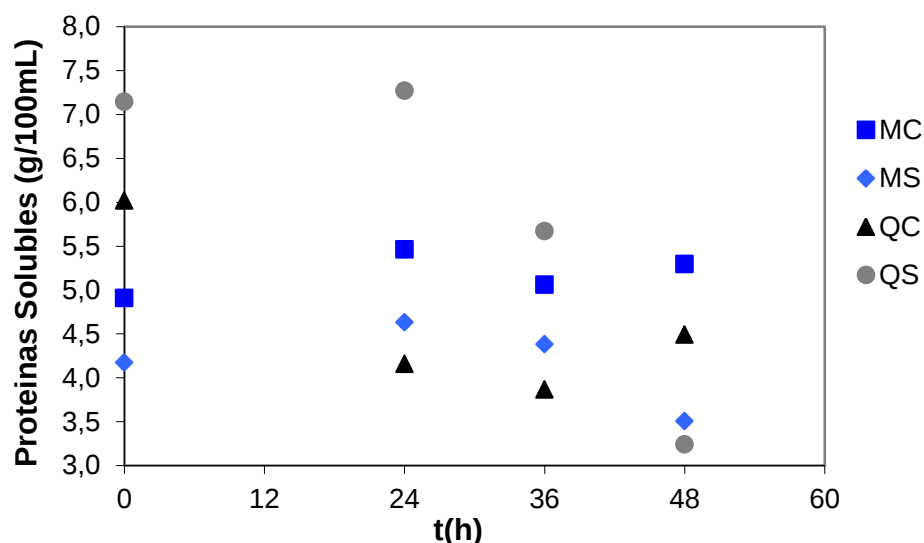


Figura 13. Concentración de proteínas solubles en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).

Tabla 11. Contenido de humedad en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).

t(h)	Humedad BH %(p/p) (%BH±DS)			
	MC	MS	QC	QS
0	47,93±0,40	52,01±0,12	49,15±0,17	59,54±0,16
24	48,12±0,33	47,03±0,24	46,56±0,58	50,49±0,16
36	48,13±0,01	46,69±0,09	46,12±0,36	46,92±0,67
48	48,62±0,53	47,67±0,10	45,52±0,52	47,46±0,47

Table 12. Contenido de cenizas en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C) en las masas de harina de maíz variedad QPM(Q) y variedad Valle (M).

t(h)	%CENIZAS BS (p/p) (%BS±DS)			
	MC	MS	QC	QS
0	1,106±0,067	1,089±0,134	1,800±0,087	2,296±0,097
24	0,928±0,035	1,305±0,082	1,437±0,102	1,934±0,087
36	1,024±0,073	0,999±0,072	1,602±0,008	1,801±0,076
48	1,331±0,075	1,165±0,065	1,533±0,090	1,715±0,102

5.6. EVALUACIÓN DEL LA REDUCCION DEL FÓSFORO FÍTICO O FITATO EN LAS MASAS FERMENTADAS DE MAIZ.

5.6.1. Contenido de fosforó fítico.

Según el análisis de varianza ANOVA de los factores y las interacciones que intervinieron en contenido de fósforo fítico en los procesos de fermentación del maíz se descartó la hipótesis nula, que indicaba que todos tratamientos eran iguales en cuanto al contenido de fósforo fítico, esta se descartó debido a la regla de decisión del análisis ANOVA ya que las $F_{teorica (1,12)}=4.17$ y $F_{teorica (2,12)}=3.89$ (Montgomery, 5ed) fueron menores a las $F_{experimentales}$ de la ANOVA para cada factor y las interacciones de los mismo (Tabla A1). Por consiguiente, se realizó a través de pruebas de intervalos de confianza Tukey con una ($p<0,05$) para todas las interacciones de los niveles de los factores (Fig. 14). Del análisis de los intervalos Tukey (Fig.14), realizados con la diferencia mínima significativa ($T_{0,05}=0,01522$) encontrada mediante la (Ec. 7.), se obtuvo que factor variedad de maíz fue relevante ya que separó las medias en dos grupos, correspondientes a los niveles del mismo, manifestado que todas los tratamientos de la variedad Valle, fueron diferentes significativamente a los de la variedad QPM para el contenido de fósforo fítico, siendo mayores las concentraciones para las masas constituidas de harina QPM. Hubo un descenso en el contenido de fósforo fítico cuando la fermentación fue acelerada en la variedad Valle (MC), siendo iguales para los tiempos 36 y 48 horas, el contenido de fósforo fítico no varió en el desarrollo de la fermentación tradicional en el maíz Valle (MS), a diferencia del tratamiento que incluían la variedad maíz QPM, que no presentaron diferencia significativas, exceptuando las 36 horas de proceso para ambas fermentaciones (QC y QS).

La fermentación aumentó el valor nutritivo del maíz a través del mecanismo de reducción del factor antinutritivos fitato o ácido fítico, debido a que el ácido fítico que es la forma más abundante de fósforo en el cereal y estas moléculas se consideran antinutrientes ya que se ligan a nutrientes como proteínas y minerales reduciendo su biodisponibilidad (Chelule *et al.*, 2010), la incorporación de cultivos iniciadores o inóculos en la fermentación acelerada ayudó en la degradación eficiente de los fitatos (Holzapfel, 2002), que principales factores antinutricionales del maíz, ya que más del 80% del contenido de fósforo fítico del grano se encuentra en el germen, y el resto en la capa de aleurona (Raboy, 2009). (Hotz y Gibson, 2007) y el IP6 es alrededor del 75% del contenido del fósforo total de la semilla (Raboy, 2009), representando el 1-2% del peso total de la

semilla (Febles *et al.*, 2001) (Palacios *et al.*, 2008). Aunque, en el contenido de las masas fue muy inferior a este valor (Fig. 14), debido a la adición de agua en la elaboración, esta humedad representa alrededor del 50% de la misma (Tabla 11.). Los principales factores que afectaron el contenido de fósforo fítico en las masas, fueron en primer lugar la variedad de maíz, debido a que las elaboradas con harina QPM tuvieron valores más altos P fítico, lo que se relacionó con el contenido inicial de minerales que fue también mayor en las masas constituidas por esta harina (Tabla. 12.).

Table 13. Contenido inicial de Fósforo fítico para masa elaboradas a partir de harina de variedades de maíz QPM (Q) y maíz común Valle (M).

Contenido inicial de Fósforo fítico %(p/p) (BS±DS)	
QPM(Q)	Valle (M)
0,3410±0,0058	0,2164±0,0035

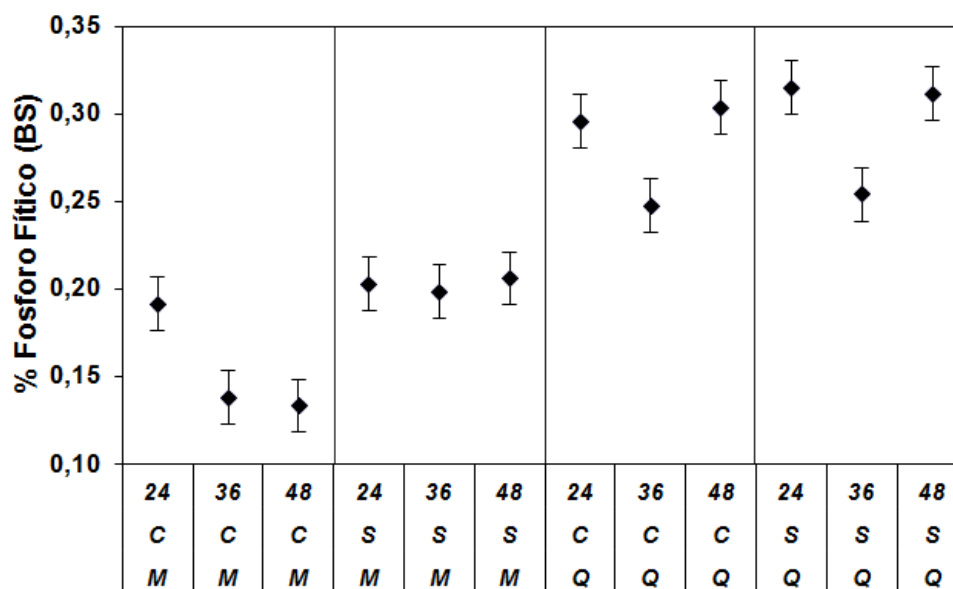


Figura 14. Contenido de fósforo fítico en el tiempo para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C), en las masas de harina de maíz QPM(Q) y Maíz variedad Valle (M); con su respectivo intervalo Tukey ($p < 0,05$).

5.6.2. Reducción de fósforo fítico.

Según el análisis de varianza ANOVA (Tabla. 15.) de los factores y las interacciones que intervinieron en reducción del fósforo fítico en la fermentación del maíz, se descartó la hipótesis nula que decía que todos tratamientos eran iguales en cuanto a la reducción de

fósforo fítico, debido a la regla de decisión del análisis ANOVA, ya que las $F_{teórica (1,12)}=4.17$ y $F_{teórica (2,12)}= 3,89$ (Montgomery, 5ed) fueron menores a las $F_{experimentales}$ de la ANOVA para cada factor y las interacciones de los mismos, esto indicó que todos los factores implicados en el experimento (variedad de maíz, tipo de fermentación y tiempo de proceso) influyen de forma significativa en la reducción de fitatos. Del análisis de los intervalos Tukey (Fig.15.), realizados con una diferencia mínima significativa ($T_{0,05}=5,66$) encontrada mediante la (Ec.7.), con la cual se estableció diferencia entre los tratamientos, dando como resultado que los tratamientos descritos por las interacciones MC36, MC48, QC36, QS36 fueron diferentes a los demás tratamientos y las máximas reducciones obtenidas en el experimento y no existe diferencia significativa entre estos, exceptuando la diferencia hay entre MC48 y QS36.

De los anteriores resultados en cuanto a la reducción de fósforo fítico, se infirió que la fermentación tuvo un efecto sobre la reducción de los compuestos antinutricionales fitato, ya que es bien conocido que la fermentación es uno de procesos más eficientes aplicados al maíz para la reducción de los mismos (Lestienne *et al.*, 2005.), debido a la hidrólisis de los compuestos de fósforo fítico que son reducidos por acción de las fitasas producidos ya sea por microorganismos inoculados o por los presentes naturalmente en el maíz (Eklund-Jonsson *et al.*, 2001). También, se encontró que los tiempos bajos de fermentación (0 a 24 horas), en los diferentes tipos fermentación (acelerada o tradicional) para las dos variedades de maíz estudiadas, no mostraron una reducción significativa del fósforo fítico, entonces en tiempos bajos de fermentación la reducción de fitatos fue limitada (Mahgoub y Elhag, 1998). Por el contrario tiempos de 36 hasta 48 horas de fermentación acelerada en el maíz Valle reducen los fitatos significativamente en un 36-38%, lo que se puede relacionar con el crecimiento de microorganismos en las fermentaciones, debido a que la fermentación acelerada con un inóculo de *L. plantarum* demostró poseer una actividad de reducción de fósforo fítico en tiempos mayores a 36 h donde todavía presentaba un crecimiento superior a 10^9 UFC/mL (Fig.5.), opuestamente en proceso de fermentación tradicional en maíz Valle en todos los tiempos el fósforo fítico permanecieron constante y la reducción fue poco significativa (Fig.15.), lo que indica que la flora microbiana presente naturalmente, responsable de esta fermentación no disminuyó el fósforo fítico a pesar que en los últimos tiempos presentaron los mayores crecimientos de BAL (Fig.5.). En los dos tipos de fermentación evaluados en el maíz variedad QPM el único tiempo que presentó una reducción significativa de fósforo fítico fue las 36 horas de proceso, donde las BAL inoculadas en la fermentación acelerada

redujeron el fósforo fítico, lo que no ocurrió a las 48 horas donde los microorganismos en esta variedad de maíz, se encontraban en fase de muerte, con una concentración mínima de BAL menor a 10^9 UFC/mL (Fig. 5.). Además, en la Figura 15 se mostró la reducción de fósforo fítico presentada a las 36 horas en el proceso tradicional para el maíz QPM (QS), la cual se relacionó el máximo crecimiento de hongos y levaduras presentado por esta fermentación para la misma combinación de factores (Tabla 10.), asimismo la poca reducción a las 48 horas para QS se relacionó con la ausencia de hongos presentada en el mismo tiempo de fermentación (Tabla 10.), ya que estos microorganismos presentes en la flora natural del maíz QPM son en parte responsables de la reducción de fósforo fítico en la fermentación tradicional, porque los hongos son productores de fitasas microbianas con alta actividad en los niveles de 3,77 y 3,53 U g⁻¹, produciendo una reducción de ácido fítico de 25 a 32% (El-Batal y Karem, 2001), estas reducciones están el orden a las alcanzadas en la fermentación tradicional de las masas QPM a la 36 h (QS36) que fue de 25,44 % , la reducción de fósforo fítico por procesos de fermentación ha sido ampliamente documentada y se relaciona con el aumento del valor nutritivo de los alimentos (Eklund-Jonsson *et al.*, 2001).

de un mecanismo de reducción de antinutrientes como ácido fítico (Fig. 14 y 15).

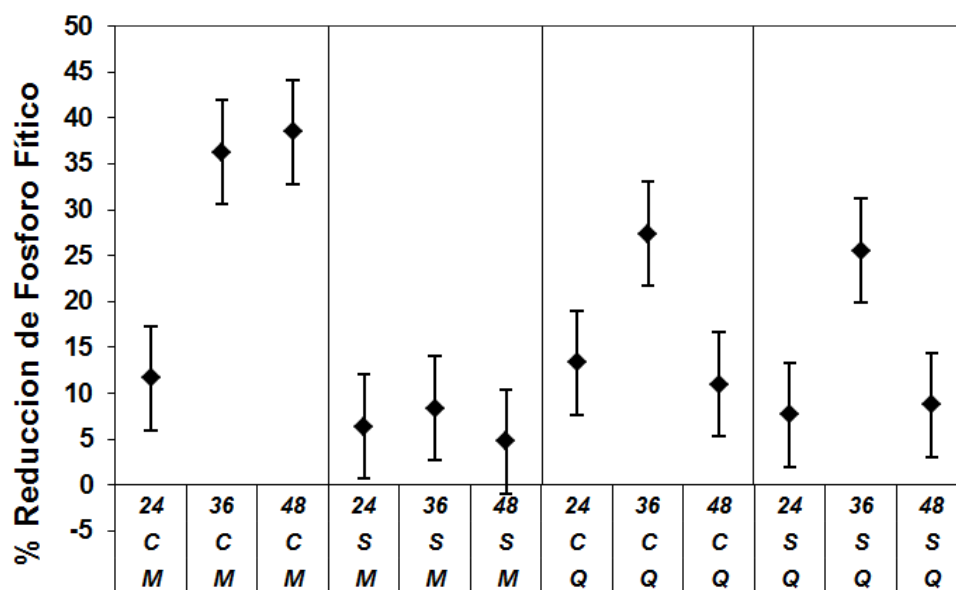


Figura 15. Reducción de fósforo fítico en el tiempo, para las fermentaciones tradicional (S) y acelerada (C), en las masas de harina de maíz QPM(Q) y maíz variedad Valle o común (M); con su respectivo intervalo Tukey ($p < 0,05$).

La fermentación tradicional de los cereales conduce a una disminución en el nivel de hidratos de carbono (Fig. 11 y 12), .Como también, algunos aminoácidos pueden ser sintetizados y la disponibilidad de vitaminas del grupo B podrían mejorar (Coulibaly *et al.*, 2011). La Fermentación también ofreció las condiciones óptimas de pH para la degradación del ácido fítico, que está presente en los cereales en forma de complejos con cationes polivalentes como hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas. El efecto de la fermentación sobre la proteína y los niveles de aminoácidos es un tema de controversia, ya que su contenido es variable dependiendo de cada caso de fermentación (Fig. 13) (Coulibaly *et al.*, 2011). La fermentación en el maíz fue un proceso que puede ser industrializado y aplicado en la obtención de productos tradicionales con una buena calidad microbiológica, mejorando la biodisponibilidad de los minerales y proteínas, a través

6. CONCLUSIONES.

La bacteria ácido láctica *L. plantarum* C31 y las características del medio de harina maíz permitieron desarrollar un inóculo láctico, que puede ser usado como un cultivo iniciador en la industrialización de productos fermentados tradicionales de maíz, asegurando una mejor calidad microbiológica en el desarrollo del proceso.

El proceso más adecuado para la elaboración de masas fermentadas de maíz, fue la fermentación acelerada con inóculo de *L. plantarum* C31, (bacteria ácido láctica aislada de maíz fermentado), en términos de calidad microbiológica en cuanto al no crecimiento de microorganismos diferentes a las bacterias lácticas, como hongos, levaduras y coliformes.

El contenido de fitato fue significativamente más alto para las masas elaboradas con maíz QPM, comparado con las que fueron realizadas con maíz Valle. La fermentación acelerada con el uso de un cultivo iniciador de *L. plantarum* C31 permitió obtener en las 36 horas de proceso masas de maíz con bajos niveles de fósforo fítico, reduciendo significativamente el contenido de fosforo fítico en un 36,3 % en las masas elaboradas de maíz de la variedad Valle y de un 27,4 % en la variedad de maíz QPM. En los procesos de fermentación los tiempos de 24 horas de proceso y la fermentación tradicional aplicada a la variedad de maíz no disminuyeron significativamente el fitato, en cambio, la microflora presente naturalmente en el maíz QPM fue capaz de reducir significativamente en 25,5 % el fitato a las 36 horas de proceso.

La fermentación acelerada con inóculo láctico de *L. plantarum* C31 permitió obtener masas fermentadas elaboradas a partir de maíz de la variedad Valle, con una buena calidad fisicoquímica, al conservar relativamente el contenido de proteínas solubles, en comparación a los resultados obtenidos con la fermentación tradicional.

El uso de microorganismos lácticos (*L. plantarum*) en el proceso de fermentación de masas de maíz, mostró ser un método aplicable en la obtención masas de maíz con el fin de ofrecer productos al consumidor de mayor calidad nutricional, al sumar el efecto que tiene de reduccion factores antinutricionales (fitato) en el proceso.

7. RECOMENDACIONES.

Analizar los costos de los procesos y materias primas para comparar en este sentido, los procesos de fermentación tradicional y acelerados aplicados a las masas de harina integral de maíz.

Realizar el análisis de digestión proteica y contenido de aminoácidos esenciales, estableciendo diferencias nutricionales en los procesos fermentativos en masas de maíz.

Realizar el análisis estadístico de la calidad sensorial de los productos elaborados en las fermentaciones, con el objetivo de comparar los procesos tradicionales y acelerados con inóculo láctico.

8. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas H. K., R. D. Cartwrightb, W. Xiec, W. T. Shierd. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. Crop Protection. 25 1–9
- AACC, 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of AACC, 10th Ed. USA.
- Adams, M.R., Nicolaidis, L., 1997. Review of the sensitivity of different pathogens to fermentation. Food Control 8 (5 – 6), 227– 239.
- Altat M, Venkateshwar M, Srijana M, Reddy G. 2007. An economic approach for L-(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. J Appl Microbiol 103 372–80.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15a ed. Official methods 925.10; 923.03. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, EEUU.
- Bata A. y Lásztity R. 1999. Detoxication of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. Trends in Food Science & Technology 10 223-228
- Bering S., Suchdev S., Sjolto L., Berqqren A., Tetens I., Bukhave K. (2006). A lactic acid fermented oat gruel increases non-haem iron absorption from a phytate-rich meal in healthy women of childbearing age. Br J. Nutr., 96(1):80-85
- Calderon M., G. Loiseau , R. Rodriguez , J.P. Guyot. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α -amylase production at pH 4.0. International Journal of Food Microbiology 80 77– 87
- Caplice E. y Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology 50 131–149
- Cárdenas O. E., 2006. Remoción de ácido fítico por ultrafiltración del agua de comienzo de maíz. Santiago de Cali, Universidad del Valle, Ingeniería de Química.
- Cebeci A. y Gurakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology 20 511–518
- Charalampopoulou D., J. A. Vázquez, S. S. Pandiellac. 2009. Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. Biochemical Engineering Journal 44 96–105

- Chelule P.K., H.P. Mbongwa, S. Carries, N. Gqaleni. 2010. Lactic acid fermentation improves the quality of *amahewu*, a traditional South African maize-based porridge. Food Chemistry 122 656–661
- Chuck-Hernandez C., E. Perez-Carrillo, S. O. Serna-Saldivar. 2009. Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize. Journal of Cereal Science 50 131–137
- Codex Standard 154-1985, Norma del Codex para la harina integral de maíz. 1995. (Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/52/CXS_154s.pdf, Consultado en: Junio 2011.)
- Coulibaly.A, B. Kouakou, J. Chen. 2011. Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology 1(1): 1-22.
- Cuevas-Rodríguez E.O., J. Milán-Carrillo, R. Mora-Escobedo, O.G. Cárdenas-Valenzuela, C. Reyes-Moreno. 2004. Quality protein maize (*Zea mays L.*) *tempeh* flour through solid state fermentation process. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37 59–67
- Cuevas-Rodríguez E.O., N.M. Verdugo-Montoya, P.I. Angulo-Bejarano, J. Milán-Carrillo, R. Mora-Escobedo, L.A. Bello-Pérez, J.A. Garzón-Tiznadoe,f, C. Reyes-Moreno. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays L.*). LWT 39 1072–1079
- De Muyncka C., I.J. Leroya, S. De Maeseneire, F. Arnautb, W. Soetaerta, E. J. Vandammea. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. 2004. Microbiological Research 159 339—346
- De Vries M. C., E. E. Vaughan, M. Kleerebezem, W. M. de Vos. 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. International Dairy Journal 16 1018–1028
- Douglas M.W., C.M.Peter, S.D. Boling, C.M. Parsons,D.H. Baker. 2000. Nutritional evaluation of low phytate and high protein corns. Poult. Sci. 79, 1586–1591."
- Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28, 350– 356.
- Eklund-Jonsson C., A. S. Sandberg, M. Larsson-Alminger. 2006. Reduction of phytate content while preserving minerals during whole grain cereal *tempe* fermentation. Journal of Cereal Science 44 154–160

- El-Batal A. I., H. A. Karem. 200. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. Food Research International 34 715–720
- Fageer A. S. M., E. E. Babiker, A. H. El Tinay. 2004. Effect of malt pretreatment and/or cooking on phytate and essential amino acids contents and in vitro protein digestibility of corn flour. Food Chemistry 88 261–265
- FAO,1993. El maíz en la nutrición humana. (Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>. Consultado en: Junio 2011)
- FAO, 2011. Dirección de Estadística. (Disponible en: <http://faostat.fao.org>. Consultado en: Junio 2011).
- Febles C. I., A. Ariasa, A. Hardissonb, C. Rodríguez-Álvarez, A. Sierra. 2001. Phytic acid level in infant flours. Food Chemistry 74 437–441
- Fenalce, 2009. Situación actual para el maíz y el frijol en Colombia, 2009 (Disponible en: <http://www.fenalce.org/archivos/situacionmf.pdf>, Consultado en: Junio 2008)
- Frank R., M.D. Greer, F. Nancy,M.D. Krebs. 2006. Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children and adolescents. Pediatrics, American Academy of Pediatrics, ISSN: 1098–4275.
- Frontela C., F.J. García-Alonso, G. Ros, C. Martínez. 2008. Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: The effect of processing. Journal of Food Composition and Analysis 21 343–350
- Fu W. y Mathews A.P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. Biochemical Engineering Journal 3 163-170
- García-Esteva R.M., E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova , 1999. Phytic acid content in milled cereal products and breads. Food Research International 32, 217–221.
- Gewin V. 2003. Genetically modified corn environmental benefits and risks. PLoS Biol 1 15–19.
- Gilliland S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 87, 175–188.

Giraud E., A. Champailier, M. Raimbault. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 60 4319– 4323.

Giraud E., 1992 contribution a l'étude physiologique et ezimologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolee du mandioc ferment, these université dem Provence aix-Marseille.

Graf E. y J. W. Eaton. 1993. Supression of colonic cancer by dietary phitic acid. Nutrition and Cancer, 19, 11-19

Gupta S., N. Abu-Ghannama, A. G. Scannell. 2010. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. doi:10.1016/j.fbp.2010.10.001

Hammond B.G. y Jez J.M. 2011. Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. Food and Chemical Toxicology 49 711–721

Harland, B. F., & Oberleas, D. 1986. Anion-Exchange method for determination of phytate in foods: Collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry. 69 667-670.

Harland, B.F., Oberleas, D., 1987. Phytate in foods. World Review of Nutrition and Dietetics 52, 235–259.

Helland M. H., T. Wicklund, J. A. Narvhus. 2004. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. International Journal of Food Microbiology 91 305– 313

Holzappel W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. Food Control 8 241–258.

Holzappel W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale International Journal of Food Microbiology 75 197– 212

Hotz C. y Gibson R. S., 2011. Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. The Journal of Nutrition, Symposium: Food-Based Approaches to Combating Micronutrient Deficiencies in Children of Developing Countries. (Disponible en jn.nutrition.org. Consultado en: Mayo, 2011)

Hurrell, R. F. 1997. Bioavailability of iron. European Journal of Clinical Nutrition. 51. 4–8.

- Hurrell R.F. 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.* 133 2973–2977.
- Hurrell, R.F., 2004. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 74 (6), 445–452.
- Konings W. N., J. Kok, O. P. Kuipers, B. Poolman. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology* 3 276–282
- Kunene N.F., I. Geornaras, A. von Holy, J.W.Hastings. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1084–1092.
- Latta M. y M. Eskin. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 28 1313-1315.
- Lehrfeld, J. 1994. HPLC separation and quantification of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2726-2731.
- Lestienne I., C. Icard-Vernière, C. Mouquet, C. Picq, S. Trèche. 2005. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry* 89 421–425
- Liang J., B. Han, M.R. Nout, R. J. Hamer. 2008 Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry* 110 821–828
- Lolas GM., N. Palamidis, P. Markakis. 1976. The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chem.*, 53:867-871.
- Magdi A. O. 2004. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during *Khamir* (local bread) fermentation. *Food Chemistry* 88 129–134
- Mahgoub S. E. O. y S. A. Elhag. 1998. Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chemistry*, Vol. 61, 77-80,

Marfo, E. K., Simpson, B. K., Idowu, J. S., & Oke, O. L. (1990). Effect of local food processing on phytate level in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38, 1580–1585.

McCabe, W. L. y J. C. Smith. 1991. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*, Cuarta Edición, Editorial Mc Graw Hill, México.

McDonald L.C., H.P Fleming ., H.M. Hassan. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology* 56 2120– 2124.

McMillan B., D.R. Riggs, B.J. Jackson, C. Cunningham, D.W. McFadden. 2007. Dietary influence on pancreatic cancer growth by catechin and inositol hexaphosphate, *J. Surg. Res.* 141 115–119.

Mendoza C., F. E. Viteri, B. Lönnerdal, K. A. Young, V. Raboy, and K. H. Brown. 1998. Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am J Clin Nutr* 68 1123–1127.

Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426– 428.

Montgomery Design And Analysis Of Experiments. Douglas C. Montgomery, fifth edition.

Motarjemi Y. 2002. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75 213– 229

Mugula J.K. , S.A.M. Nnko, J.A. Narvhus, T. Sørhaug. 2003. Microbiological and fermentation characteristics of *togwa*, a Tanzanian fermented food *International Journal of Food Microbiology* 80 187– 199

Naqvi S., K. Ramessar, G. Farré, M. Sabalza, B. Miralpeix, R. M. Twyman, T. Capell, C. Zhu, P. Christou. 2011. High-value products from transgenic maize. *Biotechnology Advances* 29 40–53"

Nche P.F., G.T. Odamtten, M.J.R. Nout, F.M. Rombouts. 2010. Dry Milling and Accelerated Fermentation of Maize for Industrial Production of *Kenkey*, a Ghanaian Cereal Food.

NTC, 1993. Norma técnica colombiana 493. (Disponible en: www.sinab.unal.edu.co/ntc/NTC479.pdf. Consultado en: Julio 2011.)

- Palacios M. C., M.Haros, C. M. Rosell, Y. Sanz. 2008. Selection of phytate-degrading human bifidobacteria and application in whole wheat dough fermentation. *Food Microbiology* 25 169–176
- Pandey, A., G. Szakacs, C. Soccol, J. Rodriguez-Leon, V. Zoclo. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.* 77, 203–214.
- Park H. R., H.J. Ahn, S. H. Kim, C. H. Lee a, M. W. Byun, G. W. Lee. 2006. Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. *Food Control* 17 727–732
- Pescuma M., E. M. Hébert, F. Mozzi, G. F. de Valdez. 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology* 25 442–451
- Peter C. M. y D. H. Baker. Bioavailability of phosphorus in corn gluten feed derived from conventional and low-phytate maize. *Animal Feed Science and Technology* 95 (2002) 63–71
- Raboy V. , P. Gerbasi, K.A. Young, S. Stoneberg, S.G. Pickett, A.T. Bauman, P.P.N. Murthy, W.F. Sheridan, D.S. Ertl. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124 355–368.
- Raboy V. 2003. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64 1033–1043
- Raboy V. 2009. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science* 177 281–296
- Ramirez C. 2005. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. [Tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia. 44-50
- Rasmussen R.R., P.H. Rasmussen, T.O. Larsen, T.T. Bladt, M.L. Binderup. 2011. In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food and Chemical Toxicology* 49 31–44
- Reddy G., Md. Altaf , B.J. Naveena , M. Venkateshwar, E. Vijay-Kumar. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnology Advances* 26 22–34
- Rodríguez-Couto S. y M. A. Sanromán. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering* 76 291–302

Sandberg A.S, Ahderinne R. (1986). HPLC method for determination of inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates in foods and intestinal contents. *Journal of Food Science*. Vol. 51, 547-550.

Sandoval T. A., 2005. Cuantificación de fitatos por espectroscopia visible en dos poblaciones de frijol común (*Phaseolus Vulgaris L.*) e identificación de QTLs asociadas a su contenido, Santiago de Cali, Universidad del Valle, Química.

Sefa-Dedeh S. , B.Cornelius, E. O. Afoakwa. 2003. Effect of fermentation on the quality characteristics of nixtamalized corn. *Food Research International* 36 57–64

Shamsuddin A. M. 2002. Anti-cancer function of phytic acid, *Int. J. Food Sci. Technol.* 37 769–782

Statistical Software Minitab 15, paquete software estadístico (Disponible en: <http://www.minitab.com/en-US/default.aspx>, Consultado en: Mayo 2011)

Talon R., S. Leroy, I. Lebert. 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77 55–62

USDA, 2011. USDA-FAS. World corn production, consumption and stocks report. Washington DC. (Disponible en: <http://www.fas.usda.gov/grain/Current/>, Consultado en: Julio 2011).

Valerio F., P. De Bellis, S. L. Lonigro, A. Visconti, P. Lavermicocca. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* roty spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 122 328–332

Vanegas D. C., 2009. Efecto de la fermentación láctica sobre las características texturales, fisicoquímicas y microbiológicas de masas de maíz. Santiago de Cali, Universidad del Valle, Ingeniería de alimentos.

Yousif N. E., A. H. El Tinay. 2000. Effect of fermentation on protein fractions and in vitro protein digestibility of maize. *Food Chemistry* 70 181-184

Zago, M. E. Fornasari, D. Carminati, P. Burns, V. Suárez, G. Vinderola, J. Reinheimer, G. Giraffa. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28 1033 -1040

Zimmermann B, H. J. Lantusch, U. Langbein, W. Drochner (2002). Determination of phytase activity in cereal grains by direct incubation. *J Anim Physiol. A Anim Nutr.*; 86:347-352.

ANEXOS.

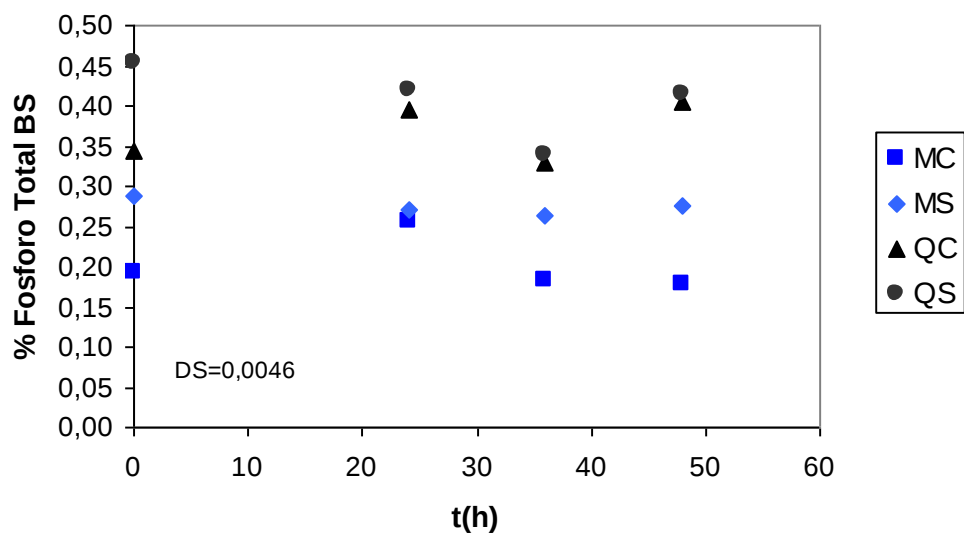


Figura A1. Concentración de fósforo (base seca) para las fermentaciones tradicional (S) y acelareda (C) en las masas de harina de maíz la variedad QPM(Q) y variedad Valle (M)

Tabla 14. Análisis de varianza ANOVA para Reducción de fósforo fítico. Donde, GL: Grados de libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Cuadrados medios, $F_o = MC_t / MCE$

Fuente de la variación	GL	SC	SC	MC	F _o
Maíz	1	25,05	25,05	25,05	12,33
Fermentación	1	977,28	977,28	977,28	481,24
Tiempo	2	866,14	866,14	433,07	213,26
Maíz*Fermentación	1	544,9	544,9	544,9	268,32
Maíz*Tiempo	2	292,28	292,28	146,14	71,96
Fermentación*Tiempo	2	170,85	170,85	85,42	42,07
Maíz*Fermentación *Tiempo	2	290,31	290,31	145,16	71,48
Error	12	24,37	24,37	2,03	
Total	23	3191,18			
S = 1,42504 R-cuad. = 99,24% R-cuad.(ajustado) = 98,54%					

Tabla A2. Análisis de varianza ANOVA para contenido de fósforo fítico. Donde, GL: Grados de libertad, SC: Suma de Cuadrados, MC: Cuadrados medios, $F_0 = M_{Ct}/M_{CE}$

Fuente de la variación	GL	SC	SC	MC	F ₀
Maíz	1	0,0720976	0,0720976	0,0720976	4918,26
Fermentación	1	0,0052688	0,0052688	0,0052688	359,42
Tiempo	2	0,0072959	0,0072959	0,003648	248,85
Maíz*Fermentación	1	0,0020776	0,0020776	0,0020776	141,73
Maíz*Tiempo	2	0,0030605	0,0030605	0,0015303	104,39
Fermentación*Tiempo	2	0,0006688	0,0006688	0,0003344	22,81
Maíz*Fermentación *Tiempo	2	0,0015505	0,0015505	0,0007752	52,88
Error	12	0,0001759	0,0001759	0,0000147	
Total	23	0,0921956			
S = 0,00382873 R-cuad. = 99,81% R-cuad.(ajustado) = 99,63%					

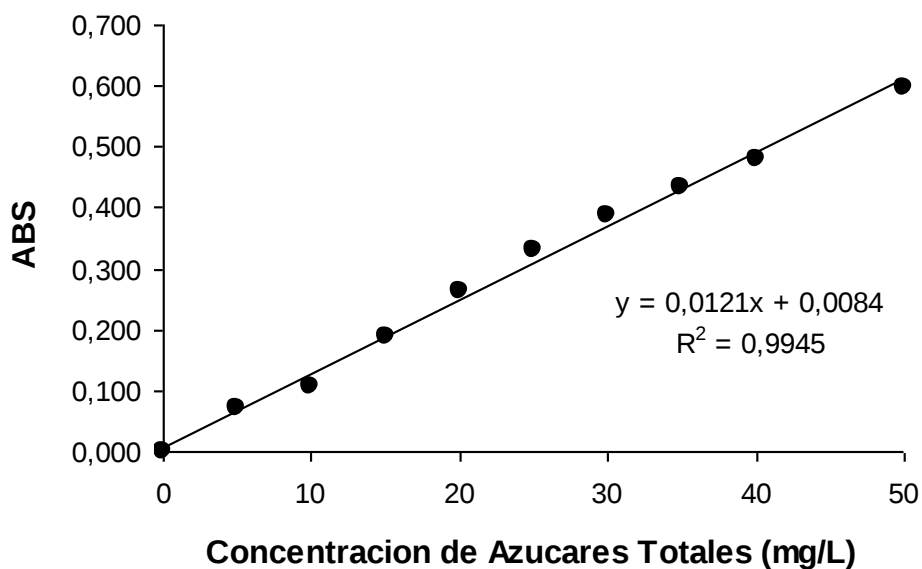


Figura A2. Curva de calibración usada para la determinación de Azúcares totales.

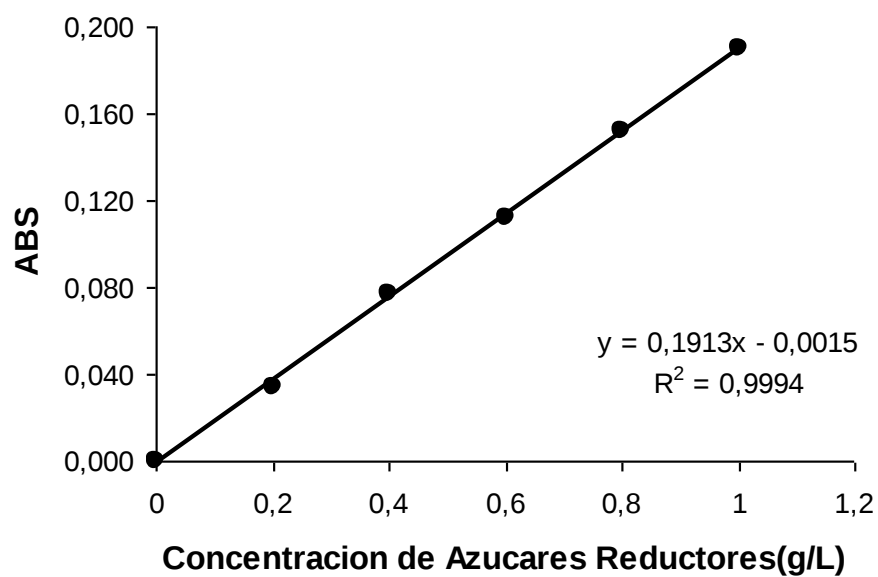


Figura A3. Curva de calibración usada para la determinación de azucares reductores.

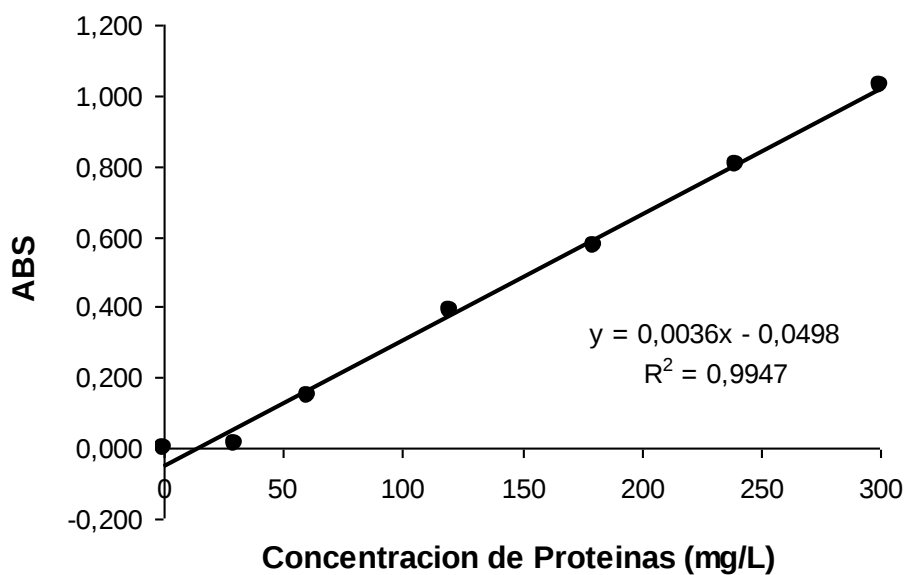


Figura 2. Curva de calibración usada para la determinación de proteínas solubles.