

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Casa abierta al tiempo

**TRANSFORMACIONES MORFOLÓGICAS Y FISICOQUÍMICAS DE
ALMIDÓN DE MAÍZ POR FERMENTACIÓN CON *Saccharomyces
cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y
*Aspergillus oryzae var. oryzae***

TESIS

**para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología**

PRESENTA

Maria Isabel Reyes Arreozola

Directores

Dr. Francisco Cruz Sosa

Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Asesora:

Angélica Román Guerrero

Ciudad de México. 1 de Febrero del 2017.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Edificio W-107 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez, Dr. Francisco Cruz Sosa y Dra. Angélica Román Guerrero.

El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto número 236500 de Ciencia Básica.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a María Isabel Reyes Arreozola con número de apoyo 353293 para la realización de esta investigación.

México D.F. a 1 de Febrero del 2017

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**TRANSFORMACIONES MORFOLÓGICAS Y FISICOQUÍMICAS DE
ALMIDÓN DE MAÍZ POR FERMENTACIÓN CON *Saccharomyces***

cerevisiae, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y

Aspergillus oryzae var. *oryzae*

que presentó

María Isabel Reyes Arreozola

Comité Tutorial:

Co-Director: Dr. Francisco Cruz Sosa
Co-Director: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez
Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero



Jurado:

Presidente: Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz

Secretaria Dra. Ma. del Carmen Hernández Jaimes

Vocal: Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Vocal: Dra. Landy Hernández Rodríguez



Agradecimientos

Al Dr. Jaime Vernon Carter, responsable del laboratorio W-107 por el apoyo, asesoramiento, revisión y financiamiento brindado para la realización de este trabajo. Gracias por permitirme formar parte de un excelente equipo de trabajo.

Al Dr. José de Jesús Álvarez por la dirección y apoyo brindado para la realización de este trabajo. Gracias por darme la oportunidad de lograr esta meta en mi vida, por confiar en mí y por compartir sus conocimientos y enseñanzas.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa y Dra. Angélica Román, gracias por apoyarme en todo momento, por aceptarme como su alumna, por su asesoramiento y revisión en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz, Dra. Ma. del Carmen Hernández Jaimes, Dra. María Eva Rodríguez Huevo y a las Dra. Landy Hernández Rodríguez por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, sus valiosos comentarios y sugerencias que me brindaron.

Agradezco a la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano y al Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda por las cepas proporcionadas para la realización de esta investigación.

Agradezco al Laboratorio Central de Microscopia Electrónica de la UAM-Iztapalapa y a la Dra. Patricia Castillo por su apoyo brindado para realización de las imágenes que se muestran en la presente investigación.

Al Dr. Víctor Hugo Lara Corona gracias por apoyarme en la realización de los estudios de difracción de Rayos-X.

A la Técnico Laboratorista Febe Arzola Hernández del laboratorio T-167-168 por su apoyo y préstamo de material para la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio W-107 a Ángeles, Amor, Joselyn, Yasuir, César, Samuel, Héctor, Daniel y Manolo por compartir sus conocimientos además de enseñarme el uso y manejo de cada uno de los equipos. Gracias a todos por su apoyo, confianza y que el trabajo fuera más divertido y placentero.

A mis amigos Christian, Adela y Gregorio, gracias por apoyarme en esta decisión que cambio mi vida.

A mi novio Alejandro Barrios Nolasco por todo su apoyo incondicional, amor y cariño.

En especial, a mi mamá María de los Ángeles Arreozola y mi papá Jacinto Reyes, por apoyarme en todo momento y pese a la distancia siempre confiar en mí. A mis hermanas Rosario, Ivonne, Perla, mi hermano Cristian, por darme el valor para tomar la decisión de vivir lejos de casa.

Dedicatoria

A Dios...

A mis padres María de los Ángeles Arreozola Ramos y Jacinto Reyes Contreras

A mis Hermanas Perla, Ivonne, Rosario

A mi hermano Cristian

Gracias por su amor y por su apoyo.

Al Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Gracias por todas sus enseñanzas y por permitirme ser parte de su excelente equipo de trabajo.

A mi novio Alejandro Barrios Nolasco

Por tu comprensión y amor.

A todas las personas que me apoyaron durante mi estancia en esta ciudad.

Resumen

Desde la antigüedad, los alimentos han sido producidos y conservados por fermentación incluyendo cerveza, vino, productos lácteos (yogurt, quesos), sake (vino de arroz), panes, frutas, etc. El almidón es la fuente más importante de energía para los seres humanos. La transformación en las microestructuras (amilosa y amilopectina) que conforman el almidón son las responsables de la disponibilidad de glucosa para la nutrición humana. En consecuencia, una comprensión precisa de las transformaciones fisicoquímicas y morfológicas sufridas por el almidón durante las distintas fermentaciones debe proporcionar información valiosa para el procesamiento adecuado en la producción de alimentos. En el presente trabajo, fueron realizadas dispersiones de almidón de maíz nativo (3% p/v) y sometidas a fermentación líquida con la cepa de *S. cerevisiae*, fermentación ácido láctica con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y fermentación sólida con *Aspergillus oryzae var. oryzae*. Se empleó un inóculo de 2×10^7 células mL^{-1} para todos los tratamientos evaluados. Las transformaciones fisicoquímicas en gránulos de almidón sufridas durante el tiempo de fermentación fueron monitoreadas por Microscopia óptica, SEM, XRD, FTIR, DSC e hidrólisis ácida (HCl, 1 M). Los microorganismos evaluados poseen la capacidad de producir distintos tipos de metabolitos secundarios entre los cuales destacan las enzimas, las cuales intervienen en la hidrólisis de amilosa y amilopectina, viéndose reflejado en la modificación de la estructura de los gránulos de AMF. Los estudios realizados muestran que los microorganismos actúan sobre los gránulos de almidón provocando fracturas severas en la estructura modificando el porcentaje de cristalinidad, tamaño, organización estructural (cristalinidad de corto alcance) y viscosidad. El menor tamaño de partícula de AMF se obtuvo con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, fue de $6.07 \mu\text{m}$ a las 24 h de

fermentación. Con *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron gránulos de 13.09 μm a las 168 h y con *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* fueron más prolongados los tiempos de fermentación obteniendo tamaños de 8.69 a las 192 h. El análisis de rayos-X indicó un aumento en la cristalinidad para *S. cerevisiae*, fue de 40.94 % (96 h), 39.44 % (3 h) y 38.60 % (96 h) para *L. bulgaricus* y *A. oryzae*, respectivamente. En cuanto a las propiedades térmicas la temperatura de pico (T_p) se desplazó en los tres casos evaluados 2.37 °C para *S. cerevisiae*, 2.56 °C con *L. bulgaricus* y 6.29 °C empleando una cepa de *A. oryzae*, estos resultados son indicativos de que están mejor estructurados los gránulos de AMF. La hidrólisis en condiciones ácidas rigurosas mostró una disminución de 16.98, 9.37 y 11.86 % (con *S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* y *A. oryzae* respectivamente) generando almidones resistentes a hidrólisis por lo tanto menos digeribles. La viscosidad aparente de las dispersiones gelatinizadas a 1 s^{-1} (Pas) produjo geles débiles con viscosidades reducidas en las tres fermentaciones con valores de 6.97, 2.64 y 1.37 (Pas) con las cepas evaluadas (*S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* y *A. oryzae*).

De esta manera, se concluye que las fermentaciones evaluadas producen almidones con alto contenido de cristalinidad, de menor tamaño, mejor estructurados y resistentes a hidrólisis ácida por lo tanto se podría afirmar que son menos digeribles.

Abstract

Since ancient times, food has been produced and preserved by fermentation including beer, wine, dairy products (yogurt, cheeses), sake (rice wine), breads, fruits, etc. Starch is the most important source of energy for humans. The transformation in the microstructures (amylose and amylopectin) that make up the starch are responsible for the availability of glucose for human nutrition. The transformation in the microstructures (amylose and amylopectin) that make up the starch are responsible for the availability of glucose for human nutrition. Consequently, accurate understanding of the physicochemical and morphological transformations undergone by starch during the various fermentations should provide valuable information for proper processing in food production. In the present work, dispersions of native maize starch (3% w / v) and liquid fermentation with the *S. cerevisiae* strain, lactic acid fermentation with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and solid fermentation with *Aspergillus oryzae var. oryzae*. An inoculum of 2×10^7 cells mL⁻¹ was used for all treatments evaluated. The physicochemical transformations in starch granules during the fermentation time were monitored by optical microscopy, SEM, XRD, FTIR, DSC and acid hydrolysis (HCl, 1 M). The evaluated microorganisms have the capacity to produce different types of secondary metabolites, among them enzymes, which are involved in amylose and amylopectin hydrolysis, being reflected in the modification of the structure of AMF granules. Studies show that microorganisms act on starch granules causing severe fractures in the structure by modifying the percentage of crystallinity, size, structural organization (short range crystallinity) and viscosity. The smaller particle size of AMF was obtained with *Lactobacillus delbrueckii subsp.*

bulgaricus was 6.07 μm at 24 h of fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* granules of 13.09 μm were obtained at 168 h and *Aspergillus oryzae var. oryzae* were longer fermentation times obtaining sizes of 8.69 at 192 h. X-ray analysis indicated an increase in crystallinity for *S. cerevisiae* was 40.94% (96 h), 39.44% (3 h) and 38.60% (96 h) for *L. bulgaricus* and *A. oryzae* respectively. As for the thermal properties, the peak temperature (T_p) in the three cases evaluated was 2.37 $^{\circ}\text{C}$ for *S. cerevisiae*, 2.56 $^{\circ}\text{C}$ for *L. bulgaricus* and 6.29 $^{\circ}\text{C}$ for *A. oryzae*. Indicative of better structured AMF granules. Hydrolysis under rigorous acidic conditions showed a decrease of 16.98, 9.37 and 11.86% (with *S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* and *A. oryzae* respectively), thus generating hydrolysis resistant starches, therefore less digestible. The apparent viscosity of the gelatinized dispersions at 1 s^{-1} (Pas) produced weak gels with reduced viscosities in the three fermentations with values of 6.97, 2.64 and 1.37 (Pas) with the evaluated strains (*S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* and *A. oryzae*).

In this way, it is concluded that the evaluated fermentations produce starches with high content of crystallinity, of smaller size, better structured and resistant to acid hydrolysis, therefore it could be affirmed that they are less digestible.

Índice	
Contenido	Pág.
I. Introducción General	1
II. Justificación	7
III. Objetivo General	8
IV. Objetivos Específicos	8
V. Hipótesis	8
Capítulo Uno	
Materiales y Métodos	9
1. Materiales y Métodos	10
1.1. Materiales	10
1.2. Cambios Estructurales de Almidón de Maíz Durante la Fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.2.1. Preparación del Inóculo	11
1.2.2. Condiciones de Fermentación	11
1.3. Transformaciones de Almidón de Maíz Durante la Fermentación Ácido Láctica con <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	12
1.3.1. Preparación del Inóculo	12
1.3.2. Condiciones de Fermentación	12
1.4. Efectos de la Fermentación en Estado Sólido (<i>Aspergillus oryzae var. oryzae</i>) sobre las Propiedades Físicoquímicas de Almidón de Maíz	13
1.4.1. Preparación del Inóculo	13
1.4.2. Condiciones de Fermentación	13
1.5. Métodos Analíticos	14
1.5.1. Microscopia Óptica	14
1.5.2. Microscopia Electrónica de Barrido	15
1.5.3. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)	15
1.5.4. Difracción de Rayos-X	15
1.5.5. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier	16

1.5.6. Caracterización Térmica del Almidón Nativo y Fermentado	16
1.5.7. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas	17
1.5.8. Potencial- ζ	18
1.5.9. Hidrólisis Ácida	18
1.5.10. Análisis Estadístico	18

Capítulo Dos

Cambios Estructurales de Almidón de Maíz Durante la Fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2. Resumen	20
2.1. Introducción	21
2.2. Resultados y discusión	25
2.2.1. Morfología de los Gránulos de Almidón Fermentado	26
2.2.2. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)	29
2.2.3. Cambios en la Cristalinidad Durante la Fermentación	31
2.2.4. Análisis de Gránulos de Almidón por FTIR	33
2.2.5. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado	35
2.2.6. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas	40
2.2.7. Potencial- ζ	41
2.2.8. Hidrólisis Ácida	42
2.3. Conclusiones	44

Capítulo Tres

Transformaciones de Almidón de Maíz Durante la Fermentación Ácido Láctica con <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	45
3. Resumen	46
3.1. Introducción	48
3.2. Resultados y Discusión	51
3.2.1. pH y Producción de Ácido Láctico	52
3.2.2. Morfología	53

3.2.3. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)	57
3.2.4. Cambios en la Cristalinidad	57
3.2.5. Análisis de Gránulos de Almidón por FTIR	59
3.2.6. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado	62
3.2.7. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas	64
3.2.8. Potencial- ζ	65
3.2.9. Hidrólisis Ácida	66
3.3. Conclusiones	68
Capítulo Cuatro	
Efectos de la Fermentación en Estado Sólido (<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i>) sobre las Propiedades Físicoquímicas de Almidón de Maíz	69
4. Resumen	70
4.1. Introducción	71
4.2. Resultados y Discusión	74
4.2.1. Morfología	74
4.2.2. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)	78
4.2.3. Análisis de Difracción de Rayos-X	79
4.2.4. Análisis de Gránulos de Almidón por FTIR	81
4.2.5. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado	83
4.2.6. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas	85
4.2.7. Potencial- ζ	87
4.2.8. Hidrólisis Ácida	89
4.2.9. Conclusiones	91
Capítulo Cinco	
Discusiones Generales	92
5. Discusiones generales	93
5.1. Morfología	93
5.2. Diámetro promedio ($d_{1,0}$)	96

5.3. Cristalinidad de Largo Alcance Durante las Fermentaciones Evaluadas	97
5.4. Cambios en la Absorbancia de la Cristalinidad de Corto Alcance (Relación $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$)	99
5.5. Comparación de la Temperatura de pico (T_p)	100
5.6. Viscosidad Aparente a 1 s^{-1} (Pas) de las Dispersiones Gelatinizadas	101
5.7. Potencial- ζ	102
5.8. Hidrólisis Ácida	105
6. Conclusiones Generales	107
VI. Referencias	110
VII. Perspectivas	129
VIII. Trabajos Derivados de la Tesis	130
IX. Anexos	131

Índice de Figuras

	Contenido	Pág.
	Capítulo Dos	
	Cambios Estructurales de Almidón de Maíz Durante la Fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Figura 2.1.	Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> utilizado para la fermentación de gránulos de almidón de maíz	25
Figura 2.2.	(a)-(e) Microscopia de luz polarizada e (f)-(j) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado (24, 48, 96 y 120 h) con <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 2.3.	Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado (24, 96 y 168 h) con <i>S. cerevisiae</i> . Las líneas verticales indican picos característicos de cristalinidad <i>tipo-A</i>	31
Figura 2.4.	Patrones de difracción de FTIR de almidón de maíz nativo y fermentado (24, 96 y 168 h) con <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 2.5.	Patrones de flujo endotérmicos de levadura, almidón de maíz nativo, almidón de maíz nativo + levadura y almidón de maíz fermentado (72 h) con <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 2.6.	Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con <i>S. cerevisiae</i>	40
	Capítulo Tres	
	Transformaciones de Almidón de Maíz Durante la Fermentación Ácido Láctica con <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	
Figura 3.1.	Cinética de crecimiento de <i>L. bulgaricus</i> en medio MRS	51
Figura 3.2.	Evolución de la concentración de pH y ácido láctico con el tiempo de fermentación	52
Figura 3.3.	(a)-(d) Microscopia óptica e (e)-(h) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado con <i>L. bulgaricus</i>	55

-
-
- Figura 3.4.** Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado con *L. bulgaricus*. Las líneas verticales denotan picos distintivos de cristalinidad de tipo-A 58
- Figura 3.5.** Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con *L. bulgaricus* 64

Capítulo Cuatro

Transformaciones Físicoquímicas de Almidón de Maíz Durante la Fermentación en Estado Sólido con *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*.

- Figura 4.1.** (a)-(e) microscopia óptica e (f)-(j) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado con *A. oryzae* 77
- Figura 4.2.** Evolución del diámetro de los gránulos con el tiempo de fermentación 78
- Figura 4.3.** Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado con *A. oryzae*. Las líneas verticales denotan picos distintivos de cristalinidad tipo-A. 80
- Figura 4.4.** (a) Espectro de FTIR para gránulos de almidón nativo y fermentado. (b) Relación de la absorbancia $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$ en función del tiempo de fermentación 82
- Figura 4.5.** Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con *A. oryzae* 86
- Figura 4.6.** Potencial- ζ en función del tiempo de fermentación 88
- Figura 4.7.** Hidrólisis ácida (2 horas) de almidón nativo y residual en función del tiempo de fermentación 89

Índice de Tablas

	Contenido	Pág.
	Capítulo Dos	
	Cambios Estructurales de Almidón de Maíz durante la Fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	
Tabla 2.1.	Cambios fisicoquímicos y morfológicos de gránulos de almidón de maíz producidos con <i>S. cerevisiae</i> a distintos tiempos de fermentación.	30
Tabla 2.2.	Evolución de las propiedades térmicas de almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con <i>S. cerevisiae</i> .	39
	Capítulo Tres	
	Transformaciones de Almidón de Maíz durante la Fermentación Ácido Láctica con <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>.	
Tabla 3.1.	Evolución de los parámetros fisicoquímicos con el tiempo de fermentación	61
Tabla 3.2.	Evolución de las propiedades térmicas del almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con <i>L. bulgaricus</i> .	63
	Capítulo Cuatro	
	Transformaciones Fisicoquímicas de Almidón de Maíz durante la Fermentación en Estado Sólido con <i>Aspergillus oryzae var. oryzae</i>.	
Tabla 4.1.	Evolución de las propiedades térmicas del almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con <i>A. oryzae</i> .	84
	Capítulo Cinco	
	Discusiones Generales	
Tabla 5.1.	Diámetro promedio ($d_{1,0}$) de los gránulos de almidón.	96
Tabla 5.2.	Cristalinidad de largo alcance durante las fermentaciones evaluadas.	98
Tabla 5.3.	Comparación en la relación $1047 \text{ cm}^{-1} / 1022 \text{ cm}^{-1}$.	99
Tabla 5.4.	Comparación de la Temperatura de pico (T_p).	100

Tabla 5.5.	Viscosidad Aparente a 1 s^{-1} (Pas) de las Dispersiones Gelatinizadas.	102
Tabla 5.6.	Potencial- ζ de las fermentaciones evaluadas.	103
Tabla 5.7.	Hidrólisis ácida de las fermentaciones evaluadas.	105

Abreviaturas

Símbolo	Nombre
AMN	Almidón de maíz nativo
AMF	Almidón de maíz fermentado
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
XRD	Difracción de Rayos-X
FTIR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FAL	Fermentación Ácido Láctica
FES	Fermentación en Estado Sólido
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GRAS	Generalmente Reconocidos como Seguros

I. Introducción General

El almidón se deposita como gránulos en tejidos de almacenamiento de granos, tubérculos, raíces, y en menor cantidad se encuentra presente en los tejidos vegetativos de plantas (Copeland y col., 2009). El almidón está compuesto químicamente por dos polisacáridos, la amilosa (α -D-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1-4) en una cadena lineal) y la amilopectina (conformada α -D-glucopiranosas por cadenas altamente ramificadas en la que hay uniones de α -(1-4) y muchos enlaces α -(1-6)). Los gránulos de almidón tienen una estructura jerárquica que se puede observar fácilmente mediante microscopía óptica y electrónica. Múltiples capas concéntricas de los llamados anillos de crecimiento de diámetro creciente se extienden desde el *hilum* (el centro de crecimiento) hacia la superficie de los gránulos. Los anillos de crecimiento son típicamente 120-400 nm de espesor, el patrón concéntrico de capas semicristalinas es responsable de la birrefringencia de los gránulos de almidón nativo, cuando se observa bajo microscopía de luz polarizada (Copeland y col., 2009). La diversidad de propiedades funcionales específicas de los almidones necesarias para la industria alimentaria es casi ilimitada. Ningún otro ingrediente proporciona textura a tanta variedad de alimentos como el almidón, por ejemplo, sopas, cocidos, salsas, relleno para tartas o flanes, el almidón proporciona un producto consistente y estable durante el almacenamiento al gusto del consumidor. La mayor parte del almidón consumido por los seres humanos ha sufrido alguna forma de procesamiento, que generalmente implica calentamiento en presencia de humedad bajo cizallamiento y después enfriamiento. Durante el tratamiento térmico, los gránulos de almidón se gelatinizan, perdiendo su cristalinidad y su organización estructural. La gelatinización se produce cuando el almidón nativo se calienta en presencia de humedad suficiente. Los gránulos absorben agua y se hinchan, y la organización

cristalina se rompe irreversiblemente. De acuerdo con la teoría de Jenkins y Donald (1998), primero el agua entra a los anillos de crecimiento amorfo y, en cierto grado de hinchamiento, el estrés disruptivo se transmite a través de las moléculas de conexión desde las regiones amorfas a las cristalinas. La temperatura de gelatinización de la mayoría de los almidones está entre 60 y 80 °C. En reposo, los geles de almidón se retrogradan y forman cristales *tipo-B* insolubles debido a la asociación de regiones lineales de enlaces α -[1-4] de unidades de glucosa unida en los polímeros (Gidley, 1989). La retrogradación es un proceso continuo que ocurre durante un período prolongado. La amilosa se retrograda durante minutos a horas y amilopectina durante horas a días, dependiendo de la capacidad de las cadenas ramificadas para formar asociaciones. La retrogradación de la amilosa en los alimentos procesados se considera importante para las propiedades relacionadas con la pegajosidad, la capacidad de absorber el agua y la digestibilidad, mientras que la retrogradación de la amilopectina es probablemente el determinante más importante en el endurecimiento de pan y pasteles (Tran y col., 2001).

El almidón nativo posee diversas propiedades no deseables de insolubilidad, desarrolla una falta de viscosidad en agua fría, falta de hinchamiento en los gránulos e incontrolada viscosidad después de la cocción debido a esto, se realizan diversas modificaciones del almidón para llevar a cabo una mejora de sus propiedades en la deficiencia de los almidones nativos. Existen diferentes modificaciones entre las cuales destacan las modificaciones químicas como la silylación (Jariyasakoolroj y Chirachanchai, 2014), esterificación (Miladinov y Hanna, 2000), eterificación (Wokadala y col., 2014), injerto de polímero (Li y col., 2013; Li y col., 2012) e hidrólisis ácida (Utrilla-Coello y col., 2014). Entre las modificaciones físicas se encuentran el tratamiento de presión osmótica, congelación profunda, congelación y descongelación,

agitación mecánica, tratamiento de pulsos eléctricos. Por otra parte, las modificaciones enzimáticas son llevadas a cabo por diferentes enzimas entre las cuales destacan la α -amilasa, β -amilasa, amilomaltasa (EC 2.4.1.25), α -1,4- α -1,4 glucosiltransferasa, ciclomaltodextrinasa (EC 3.2.1.54) y glucoamilasa (1,4- α -D-glucano glucosidasa EC 3.2.1.3) entre otras (Kaur y col., 2012). Los almidones modificados son empleados como adhesivos, que se tratan con ácidos o bases y se modifican con oxidantes, sales y alcoholes. Estos almidones se utilizan como adhesivos en gomas de cola de fusión, estampillas, encuadernación, sobres, etiquetas. En explosivos como adhesivo para la cabeza de los fósforos y en el papel como recubrimientos de papel y pañales desechables. También son utilizados en la construcción como aglutinante para tabiques de concreto, adhesivo para madera laminada y como adhesivo de metal poroso además en aglutinantes para núcleos de fundición. Por su parte, los almidones textiles son gelatinizados, oxidados y sometidos a diversos agentes de interconexión cruzada para ser empleados en acabado de telas y estampados. En la industria cosmética son empleados en maquillajes y cremas faciales. La industria farmacéutica los emplea en el revestimiento de cápsulas y agentes dispersantes. Por su parte la minería los usa en la separación de minerales por flotación y sedimentación, y algunos otros usos en películas de plásticos biodegradables y baterías secas. Las utilidades de almidones complejos destacan en los productos de papel. Los almidones sirven para dar mayor fuerza a los pañuelos y toallas de papel, y permiten aprovechar más el papel reciclado en cartón macizo y cartón. La exigencia cada vez mayor de que los productos sean biodegradables aumentará el volumen, ya que el almidón se utiliza en las películas y hojas de plástico, así como en las fórmulas de fibras naturales que irán reemplazando a las espumas de plástico.

Es importante modificar los almidones para lograr aumentar la solubilidad del almidón en agua fría además de generar una alta capacidad de hinchamiento y viscosidad controlada después de la cocción, extendiendo la utilidad del almidón modificado para el empleo en muchas aplicaciones industriales (Aggarwal y Dollimore, 1998).

Por otra parte, una propiedad funcional del almidón que es de particular interés para la nutrición es su susceptibilidad a la digestión. El almidón contribuye un 50-70% de energía en la dieta humana, proporcionando una fuente directa de glucosa, que es un sustrato esencial en el cerebro y glóbulos rojos para generar energía metabólica (Perry y col., 2007). Diversas enfermedades provocadas por la dieta se han presentado por el consumo excesivo de almidón entre las cuales destacan el índice glucémico (Copeland y col., 2009). El almidón que no es degradado rápidamente por las enzimas digestivas humanas en el intestino superior ha sido asociado con beneficios para la salud debido a una liberación más lenta de glucosa en el torrente sanguíneo, lo que resulta en una reducción de la glucemia y la insulina. El nombre “almidón resistente” se utiliza para describir el almidón en los alimentos que se digieren incompletamente. Topping y Clifton (2001) describen que la resistencia del almidón a la digestión humana puede deberse a distintos factores como a propiedades intrínsecas, los cambios durante el procesamiento, la retrogradación, modificación química o debido a interacciones con otros constituyentes de alimentos como por ejemplo la interacción con lípidos. El almidón no digerido o parcialmente digerido que pasa de la parte superior del intestino al inferior se considera un prebiótico, ya que es un buen sustrato para la microflora benéfica del intestino asociada con la salud del colon. Tratar de obtener almidones con propiedades de digestión lenta es un objetivo importante para la industria alimentaria. La absorción de agua, y presumiblemente el acceso enzimático, ocurre

primero en las regiones amorfas de los gránulos. El ataque por α -amilasa sobre el almidón de trigo se caracteriza por la formación de agujeros y disrupción del núcleo del gránulo formando numerosos canales hacia el centro del gránulo (Gallant y col., 1973). El tamaño y la distribución de los gránulos del almidón es importante para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, los gránulos pequeños del almidón de arroz lo hacen muy adecuado para el acabado de las telas finas y para los cosméticos para la piel. Un almidón como el del trigo no podría utilizarse -por lo menos no sin modificarlo-, debido a la distribución bimodal de sus gránulos, cuya dimensión media varía de 6.5 a 19.5 micras. Otras características físicas simples, importantes en la funcionalidad, son la forma y superficie de los gránulos, factores críticos cuando se utiliza el almidón como portador de colores en la superficie, de sabores y condimentos. Estas cualidades son funciones de la proporción entre amilasa y amilopectina de los almidones. Ambos polímeros tienen estructuras muy distintas -lineal la de la amilasa y ramificada la de la amilopectina-, y cada una de ellas tiene una importancia fundamental en la funcionalidad última del almidón original y sus derivados: la viscosidad, resistencia al corte, gelatinización, textura y solubilidad, pegajosidad, estabilidad del gel, capacidad de absorción de agua en frío y retrogradación dependen de la relación amilosa/amilopectina. Actualmente, la industria alimentaria utiliza en gran medida las modificaciones enzimáticas por ser una alternativa segura, específica y eficiente. Sin embargo, una desventaja es el alto costo de las diferentes enzimas empleadas en las modificaciones de almidón. Una aplicación para el procesamiento de alimentos con alto contenido de almidón es la producción de enzimas producidas *in situ* por levaduras, hongos y bacterias mediante el uso de fermentación. La fermentación es un proceso bioquímico que mediante el uso de microorganismos ha sido empleado desde la antigüedad para la producción de alimentos.

Distintos géneros microbianos han sido utilizados en la producción de pan, yogurt, vino, queso, etc. La Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drugs Administration) ha reconocido a *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Aspergillus oryzae* como microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) para su uso en alimentos. Actualmente, *S. cerevisiae* es sin duda la levadura más empleada en la fabricación de pan por proporcionar diversas características organolépticas y texturales. Por su parte, *L. bulgaricus* es empleado para la producción de ácido láctico y elaboración de productos lácteos fermentados. La fermentación sólida se ha destacado por el uso de hongos como *A. oryzae* que es empleado en la producción de queso y bebidas fermentadas. En el presente estudio se busca conocer cuales parámetros (viscosidad, tamaño, cristalinidad) se modifican y como se modifican mediante la acción de los microorganismos. Probablemente, en estudios posteriores se busque mejorar alguno de estos parámetros. La idea fundamental es que los procesadores de alimentos puedan modificar gradualmente, mediante la fermentación, las propiedades de los gránulos de almidón.

II. Justificación

El uso de las fermentaciones es sin duda un éxito para la industria alimentaria. La obtención de un alto número de productos alimentarios fermentados cada vez es mayor. El empleo de *S. cerevisiae* en la producción de pan o vinos es bien conocido, mientras que *L. bulgaricus* es utilizado en la producción de bebidas probióticas fermentadas como es el caso del yogurt y *A. oryzae* por su capacidad de producción enzimática es usada en la elaboración de quesos y bebidas alcohólicas tradicionales. La mayoría de estos productos son elaborados con almidón procedente de diferentes fuentes (maíz, arroz, yuca, etc.) en muchos de los casos el proceso es artesanal y espontáneo. Para las grandes industrias de alimentos son deseables los sistemas de control de calidad apropiados, para establecer parámetros de fabricación estandarizados que contribuyan al desarrollo de nuevos conocimientos. Sin embargo, los almidones modificados se utilizan ampliamente para superar la variabilidad de almidones nativos y su falta de versatilidad en una amplia gama de condiciones de procesamiento. El interés del consumidor en "alimentos más naturales" está aumentando, y por lo tanto hay una necesidad de una mayor comprensión de cómo el procesamiento y el rendimiento nutricional están relacionados con la morfología del almidón.

En este trabajo, se aprovechó la limitada producción de las enzimas amilolíticas de *S. cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Aspergillus oryzae var. oryzae* para explorar la viabilidad de estos microorganismos para modificar las propiedades estructurales y funcionales del almidón de maíz.

III. Objetivo General

Evaluar las transformaciones morfológicas y fisicoquímicas de almidón de maíz nativo empleando fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Aspergillus oryzae var. oryzae*.

IV. Objetivos Específicos

1. Evaluar los cambios estructurales de almidón de maíz durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Caracterizar las transformaciones fisicoquímicas sufridas por gránulos de almidón de maíz durante la fermentación del ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.
3. Evaluar los efectos de la fermentación en estado sólido (*Aspergillus oryzae var. oryzae*) sobre las propiedades fisicoquímicas de almidón de maíz.

V. Hipótesis

La fermentación de gránulos de almidón de maíz con *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Aspergillus oryzae var. oryzae* podrían modificar la estructura de almidón de maíz en términos de cristalinidad, digestibilidad, solubilidad, absorción de agua, viscosidad y tamaño.

Capítulo Uno

Materiales y Métodos

1. Materiales y Métodos

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados para los análisis fisicoquímicos y morfológicos evaluados para las tres fermentaciones en estudio.

1.1. Materiales

Los microorganismos empleados en las fermentaciones no están genéticamente modificados de modo que las cepas no tienen la capacidad de producir una alta actividad enzimática (amilasa).

Se utilizó una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Saftbrew s-33; emulsifier E491, Fermentis, Marcq-en-Barceul, Francia) para la primera fermentación.

En la fermentación ácido láctica se utilizó una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (*L. bulgaricus*, ATCC® 11842™). Cepa homofermentativa que produce principalmente L-(+)-ácido láctico, obtenida de la American Type Culture Collection. Las bacterias ácido lácticas se mantuvieron mediante dos propagaciones sucesivas a 38°C durante 12 h en medio MRS (55 g L⁻¹) en condiciones anaeróbicas.

En la fermentación sólida se utilizó una cepa de *Aspergillus oryzae var. oryzae* (*A. oryzae*, ATCC® 42149D2™). Como soporte inerte para la fermentación sólida se utilizó espuma de poliuretano (PUF) previamente esterilizada (121°C durante 15 min).

El almidón de maíz nativo (AMN) (S-4126, contenido de amilosa de 25.03±0.62 g 100 g⁻¹) y el ácido clorhídrico (36.5-38% HCl basis ACS reagent; product no. H7020) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El extracto de levadura, peptona de caseína, dextrosa y agar papa dextrosa se obtuvieron de BD BIOXON (Ciudad de México, México). En todos los experimentos realizados se utilizó agua desionizada.

1.2. Cambios Estructurales de Almidón de Maíz Durante la Fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1. Preparación del Inóculo

Para la preparación del inóculo, se hidrató 1 g de levadura seca (*S. cerevisiae*) en 10 ml de agua desionizada. Se utilizó el medio de cultivo YDP para la propagación conformado por extracto de levadura (10 g L^{-1}), peptona de caseína (20 g L^{-1}) y dextrosa (20 g L^{-1}) (Chiang y col., 2014). Se colocaron 200 mL de medio de cultivo en matraces de agitación de 250 mL y se ajustó el pH a 4.5 con HCl (0.01 M). El medio se inoculó con 2×10^7 células mL^{-1} y fue incubado a 38°C y 200 rpm durante 12 h. Se emplearon alícuotas de este cultivo para realizar la curva de crecimiento. Las fermentaciones de almidón de maíz se inocularon con células de 6 horas incubación.

1.2.2. Condiciones de Fermentación

Se inocularon con 2×10^7 células mL^{-1} de *S. cerevisiae* en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 200 mL de dispersiones de almidón de maíz nativo (AMN; 3% p/v). Los matraces se colocaron en un Shaker con baño de agua a 38°C , con agitación de 200 rpm durante 168 h. Las muestras de AMN y almidón de maíz fermentado (AMF_x) fueron retiradas a diferentes tiempos de fermentación (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h), y centrifugadas ($6,000 \text{ g}$) por 10 min. Los precipitados fueron secados en una estufa a 30°C hasta lograr un peso constante ($\sim 24 \text{ h}$), se colocaron en un desecador con sílice-gel en el fondo como absorbente, hasta ser requeridas para el análisis.

1.3. Transformaciones de Almidón de Maíz Durante la Fermentación Ácido Láctica con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

1.3.1. Preparación del Inóculo

Para la preparación del inóculo, se dispersó 1 g de cultivo de *L. bulgaricus* en 10 mL de medio MRS (55 g L⁻¹). El medio se incubó en condiciones anaeróbicas en un agitador orbital en baño de agua MaxQ 7000 (Terra Universal, Fullerton, CA, USA), a 38°C y 200 rpm por 6 h, produciendo 1×10⁻⁷ células mL⁻¹. Se utilizaron alícuotas de este cultivo para inocular los ensayos de fermentación con almidón (Ashraf y Shah., 2011). La cinética de crecimiento para *L. bulgaricus* fue monitoreada mediante densidad óptica a 600 nm y por conteo en placa (Par y col., 2013; Aghababaie y col., 2014)

1.3.2. Condiciones de Fermentación

Se inocularon en condiciones anaerobias 2×10⁷ células mL⁻¹ de *L. bulgaricus* en matraces Erlenmeyer (250 mL) que contenían 200 mL de dispersiones (3% p/p) de almidón de maíz nativo. Los matraces se colocaron en un agitador orbital con baño de agua a 38 °C y 200 rpm durante un máximo de 24 h. Las muestras de almidón de maíz fermentado (AMF_x) se retiraron a diferentes tiempos (el superíndice indica el tiempo de muestreo) y se centrifugaron (6,000 g) durante 10 min. Los precipitados se secaron en un horno de convección a 30 °C hasta alcanzar un peso constante (~ 24 h), se colocaron en desecadores con un lecho de gel de sílice en el fondo como absorbente, hasta ser necesario para el análisis. Al sobrenadante se le determinó ácido láctico (diferencia de la acidez titulable final y la acidez titulable inicial) por el método descrito por la AOAC (1980).

1.4. Efectos de la Fermentación en Estado Sólido (*Aspergillus oryzae* var. *oryzae*) sobre las Propiedades Fisicoquímicas de Almidón de Maíz

1.4.1. Preparación del Inóculo

Para la propagación de los hongos, se inocularon con 2×10^7 esporas de *Aspergillus oryzae* en matraces que contenían agar papa dextrosa (PDA). Los matraces inoculados fueron incubados a 35 °C durante 7 días y posteriormente fueron almacenados a 4 °C.

1.4.2. Condiciones de Fermentación

El medio de cultivo de crecimiento básico estuvo compuesto por: almidón de maíz 30 g L⁻¹; KH₂PO₄ 2.47 g L⁻¹; NH₄SO₄ 6.6 g L⁻¹; CaCl₂ 0.48 g L⁻¹; MgSO₄ · 7H₂O 0.38 g L⁻¹; NaCl 0.23 g L⁻¹; FeSO₄ 7H₂O 0.124 g L⁻¹; y 1 mL de solución mineral (Favela-Torres y col., 1998). El pH inicial se ajustó a 4.5 con HCl (0.01 M). Para el medio de cultivo, se incorporaron 1.5 g de cubos de PUF (1.0 cm³) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Para cada gramo de PUF, se emplearon 1.5 mL de esporas dando como resultado una humedad aproximada de 60.0 %. El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer mostrando un contenido de $\sim 10^7$ esporas por gramo de soporte. La incubación se realizó a 35 °C en condiciones aerobias. El proceso de fermentación se llevó a cabo a diferentes tiempos para monitorizar las transformaciones de los gránulos de almidón. Con el fin de eliminar el soporte inerte, se extrajo el almidón fermentado por presión con ayuda de una jeringa y posteriormente se centrifugaron las muestras (6,000 g 10 min). El precipitado se secó en un horno de convección (30 °C por 24 h) y se almacenó en un desecador hasta los posteriores análisis.

1.5. Métodos Analíticos

Los métodos descritos a continuación fueron empleados para los estudios fisicoquímicos y morfológicos realizados en los tres inóculos. Se llevaron a cabo de la misma forma en todos los casos evaluados.

1.5.1. Microscopia Óptica

Se utilizó microscopia de luz polarizada para examinar los cambios morfológicos de los gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos de visualización, sobre las cuales se colocó suavemente un cubre objetos. Se utilizó un microscopio Olympus BX45 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas con la cámara Carl Zeiss AxioCam ERC 5s. En los resultados presentados en los tres capítulos se presentan micrografías seleccionadas a 100x.

En los resultados mostrados en el capítulo uno, se presentan las micrográficas obtenidas utilizando luz polarizada. Las micrografías presentadas en el capítulo dos fueron teñidas con una solución de yodo (0.01 %) para lograr la visualización de los almidones y las bacterias (Bates y col., 1943). Para el caso de las micrográficas mostradas en el capítulo tres fue empleada una tinción con azul de lacto-fenol para lograr la visualización de estructuras fúngicas (López y col., 2014).

1.5.2. Microscopia Electrónica de Barrido

Para investigar las propiedades micro-estructurales de las partículas de almidón de maíz nativo y almidón sometido a fermentación se usó un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-7600F (Jeol Co. Ltd., Tokio, Japón) con el modo de SE (electrones secundarios) en 15 kV de voltaje de aceleración. Las muestras fueron colocadas en soportes utilizando una cinta adhesiva de doble cara de carbono y se cubrió con una capa de carbono por el método de evaporación con un espesor no mayor a 10nm utilizando una evaporadora Baltec modelo-SCD050 (Bradley, 1954). En la presente investigación se presentan micrografías con una amplificación de 5000x para los tres evaluados.

1.5.3. Diámetro Promedio ($d_{L,0}$)

El diámetro promedio de número-longitud de los gránulos de almidón nativos y fermentados se calculó a partir de imágenes de microscopía óptica (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japón) por medio del paquete de software de Zen-2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) (Chmelik y col., 2001).

1.5.4. Difracción de Rayos-X

Para obtener los patrones de difracción de rayos-X del almidón nativo y el almidón fermentado se utilizó un difractómetro SIEMENS-Modelo D-500 (Karlsruhe, Alemania) con landa de cobre ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) de as primario y secundario acoplado a un sistema computarizado.

El Software DIFFRAD AT fue empleado con una base de datos y tarjetero JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards). Las intensidades se midieron en un intervalo de ángulos de difracción de 4-50° con un tamaño de paso de 0.03° y tiempo de medición de 0.3 s por paso (López-Rubio y col., 2008). El cambio en el contenido de cristalinidad en función del tiempo de fermentación se calculó con el método descrito por Hermans y Weidinger (1984).

1.5.5. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo de las muestras se registraron en un espectrofotómetro de FTIR (PerkinElmer FT-IR Espectrómetro Frontier). Las muestras de almidones modificados se sometieron a espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) en el intervalo de 1200-900 cm^{-1} (van Soest y col., 1995).

1.5.6. Caracterización Térmica del Almidón Nativo y Fermentado

Las propiedades térmicas de los gránulos de almidón de maíz nativo y almidón fermentado se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (TA Instruments, Q1000, New Castle, DE, USA) previamente calibrado con Indio. Las muestras con 3 mg de almidón (base seca) y 6.0 μL de agua fueron colocadas en celdas de aluminio y las cuales fueron cerradas herméticamente y calentadas de 25 a 150 °C a una velocidad constante de 10 °C min^{-1} . Se utilizó una celda de aluminio vacía como referencia. Las temperaturas (T_o -inicio, T_p -pico, T_c -final) y las entalpías de transición térmica (ΔH , J g^{-1}) se determinaron con el uso del Software Instrumento de Análisis Universal de 2000 (New Castle, DE, USA) (Palma-Rodríguez y col., 2012).

1.5.7. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas

La viscosidad aparente de las muestras se determinó en dispersiones gelatinizadas obtenidas a partir de almidón nativo y fermentado. Se usó una prueba dinámica oscilatoria en un reómetro (Malvern Instruments, Ltd, Worcestershire, UK), usando una geometría cono-plato con un cono de rotación de 40 mm de diámetro, un ángulo 4° y un gap de 0.15 mm. Los geles se prepararon suspendiendo el almidón (5% p/p) en agua desionizada.

Las suspensiones se agitaron suavemente y se calentaron a 90 °C durante 20 min para permitir la completa gelatinización de los gránulos de almidón. Las suspensiones gelatinizadas se enfriaron a temperatura ambiente. Se colocaron cuidadosamente las muestras en el sistema de medición aproximadamente 1.6 mL y se dejaron reposar durante 10 min a 25 °C para la recuperación de la estructura y equilibrio de la temperatura.

Las curvas de flujo de las dispersiones de almidón se determinaron mediante la aplicación de una velocidad de corte de 0.1 a 100 s⁻¹ y se reportó la viscosidad aparente a una velocidad de corte de 1 s⁻¹. El comportamiento experimental de la viscosidad aparente se describió mediante una función de la ley de potencia $\eta_{app} = K_n \dot{\gamma}^{n-1}$, donde $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte, K_n es el índice de consistencia de flujo, y n es el índice de comportamiento de flujo ($n = 1$ para fluidos newtonianos y $n < 1$ para fluidos de adelgazamiento) (Carrillo-Navas y col., 2014).

1.5.8. Potencial- ζ

El potencial- ζ de dispersiones (1%) de almidón nativo y fermentado se midió con un Zetasizer-Nano ZS (Malvern, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) (Clogston y Patri, 2011).

1.5.9. Hidrólisis Ácida

Muestras de almidón nativo y fermentado (15 g, base seca) se dispersaron en una solución acuosa de ácido clorhídrico (100 mL, 1 M), con agitación y manteniendo a 38° C durante 2 h. Después de 2 h, la reacción se detuvo mediante enfriamiento a 4 °C y se centrifugó a 6,000 g durante 10 min para la recuperación de material no hidrolizado. Los precipitados se lavaron en agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro. Los precipitados fueron secados en una estufa de convección a 35 °C durante 24 h y se almacenaron a 4 °C en un recipiente de vidrio cerrado herméticamente. La conversión de hidrólisis se calculó como el porcentaje de sólidos precipitados y secos con relación a los sólidos iniciales de almidón (Kim y col., 2012; Vernon y col., 2016).

1.5.10. Análisis Estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software SAS 9.3. 3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) y una prueba de comparación de medias por Tukey.

Capítulo Dos

Cambios Estructurales de Almidón de Maíz Durante la Fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*

Resumen

Las dispersiones de almidón de maíz nativo (3% p/v) fueron sometidos a fermentación (38 °C) por la cepa de *S. cerevisiae* (2×10^7 células/mL). La fermentación fue muestreada a diferentes tiempos (tiempo máximo de 168 horas) para evaluar los cambios estructurales sufridos en los gránulos de almidón. Se encontró que las α -amilasas (enzimas amilolíticas producidas por *S. cerevisiae*) atacan al inicio de la fermentación fracturando el gránulo alrededor de la cruz de Malta. A largo plazo (96 horas y tiempos más altos), los gránulos de almidón se descomponen para producir fragmentos de diferentes tamaños. El análisis XRD indicó un aumento de cristalinidad relativa del almidón de 32.82% y alrededor de 40.94% después de 120 horas de incubación. Los cambios en la estructura del gránulo de almidón fueron corroborados con un análisis térmico que mostró un aumento en la temperatura de gelatinización y la entalpia. Sin embargo, el análisis de FTIR sugiere que la cristalinidad de corto alcance relacionado con el embalaje de doble hélice se mantuvo casi sin cambios en las primeras 120 horas. La hidrólisis en condiciones ácidas rigurosas (HCl, 1.0 M, 38 °C) indicó que la incubación con *S. cerevisiae* llevó a una digestión más lenta de pastas de almidón gelatinizado, causada probablemente por el aumento de la cantidad de empaquetamiento cristalino de las dobles hélices. En general, los resultados en este trabajo mostraron que la fermentación de gránulos de almidón con *S. cerevisiae* podría modificar positivamente la estructura de almidón de maíz en términos de digestibilidad y cristalinidad.

Palabras clave: Almidón de maíz; *S. cerevisiae*, cambios estructurales; cristalinidad.

2.1. Introducción

El almidón es un material natural, renovable y sostenible, se utiliza rara vez en su forma nativa. Para el ajuste de sus propiedades, el almidón se somete comúnmente a una enorme diversidad de modificaciones morfológicas y funcionales. El objetivo de las modificaciones es inducir cambios en las propiedades fisicoquímicas del almidón que se utilizan en un amplio dominio de aplicaciones. Entre las modificaciones químicas ampliamente utilizadas se encuentran: la siliación (Jariyasakoolroj y Chirachanchai, 2014), carbamación (Li y Cho, 2013), esterificación (Miladinov y Hanna, 2000), eterificación (Wokadala y col., 2014), injerto de polímero (Li y col., 2013b; Li y col., 2012) e hidrólisis ácida (Utrilla-Coello y col., 2014). Teniendo en cuenta los posibles peligros en el consumo de productos alimenticios que contengan almidón químicamente modificado, se han propuesto tratamientos físicos como una alternativa segura. Los estudios han demostrado que el ultrasonido afecta las propiedades funcionales del almidón provocando un aumento de la grasa y la absorción de agua, baja concentración de gelificante (a excepción del almidón de papa), solubilidad y capacidad de hinchamiento y una disminución de la viscosidad del gel (Sujka y Jamroz, 2013). El tratamiento con calor húmedo afecta parámetros térmicos de los almidones como la gelatinización y dureza del gel (Puncha-arnon y Uttapap, 2013). El tratamiento enzimático ha sido considerado en los últimos años una alternativa para la modificación del almidón debido a la alta especificidad de la acción enzimática. Por ejemplo, la α -amilasa (AM) fúngica o amiloglicosidasa (AMG) se han utilizado para la obtención de gránulos de almidón porosos a temperatura de sub-gelatinización (Dura y col., 2014). También, se ha propuesto como tratamiento el uso de la enzima dual (enzima glucógeno y amilosacarasa) para la obtención de almidón de lenta digestión (Jo y col., 2016). Se ha demostrado que el

tratamiento con la enzima de ramificación 1,4- α -glucano es capaz de retardar a corto y largo plazo la retrogradación del almidón de maíz (Li y col., 2016). La modificación combinada con hidrólisis enzimática y tratamiento térmico de almidón aumenta la formación de almidón resistente (RS), mostrando un incremento en los índices de absorción de agua y solubilidad en agua y una disminución en el poder de hinchamiento (Reddy y col., 2013). El uso de enzimas para el tratamiento de almidón es muy eficiente y específico con un importante potencial en aplicaciones industriales. Un inconveniente de la utilización de enzimas para el tratamiento de almidón es que los incrementos en los costos pueden ser excesivos para aplicaciones competitivas. De igual forma, se ha cuestionado que los residuos de enzimas (por ejemplo, amilasas) presentes en los alimentos pueden causar a los consumidores efectos secundarios como alergias y dermatitis (Green y Beezhold, 2011; Kanny y Moneret-Vautrin, 1995; Quirce y col., 1992). De esta manera, es comúnmente requerido un diseño preciso y un control estricto de la elaboración de alimentos que contengan enzimas industriales. Una alternativa del uso de enzimas industriales se basa en el tratamiento con enzimas naturales presentes en las harinas producidas in situ por cepas de hongos y levaduras modificadas. Se ha demostrado que las enzimas de hongos y levaduras del fermento de arroz pueden aumentar la capacidad de absorción (Li y col., 2013a), y modificar la digestibilidad y la cristalinidad de los gránulos de almidón de arroz residual (Zhang y col., 2016). Finalmente, el almidón de arroz modificado puede ser utilizado para el empleo de encapsulación de probióticos o como aditivo de alimentos para reducir el síndrome metabólico (McCullough, 2011). Aunque la levadura puede producir una rica diversidad de enzimas, la tasa de crecimiento suele ser demasiado lenta para aplicaciones industriales. Al respecto, se han propuesto cepas de levaduras modificadas para acelerar la modificación del almidón (Nielsen y col., 2013). Se han explorado por ingeniería de

superficie cepas de levaduras que presentan conjuntamente glucoamilasa y α -amilasa para la producción de etanol a partir de almidón de maíz nativo (Shigechi y col., 2004). Otras aplicaciones incluyen la producción de biocombustibles (Tai y Stephanopoulos, 2013), la formación de terpenos (Wriessnegger y Pichler, 2013), la producción de ácido mucónico (Curran y col., 2013), entre otros. Las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria para la producción de pan y elaboración de la cerveza. *S. cerevisiae* aprovecha los azúcares disponibles (por ejemplo, maltosa y sacarosa) para la producción de alcohol y CO₂. Específicamente, *S. cerevisiae* se emplea para la producción de etanol y horneado en todo el mundo, pero carece de la gama completa de enzimas amilolíticas, principalmente α - y β -amilasa, que participan en la ruptura de cadenas de almidón para convertirlas en glucosa. La levadura tiene dos genes involucrados en la producción de amilasas YIL099W (SGAI) y YIR019C (FLO11, MUC1 y STA4). Estas enzimas son a la vez α -glucoamilasa (EC:3.2.1.3) (Genomes, 2013). Es interesante observar que los mecanismos moleculares que fundamentan la degradación de las cadenas de almidón por α -glucoamilasas no están claros en absoluto, y recientemente se han estudiado pero sólo desde el punto de vista teórico (Morris y col., 2005). Además, la producción de α -glucoamilasa es relativamente lenta para ser utilizada en procesamientos rápidos de productos alimenticios. *S. cerevisiae* es capaz de someterse a una adaptación relativamente lenta para la producción de α -glucoamilasas, bajo la presencia de almidón insoluble y deficiencia de azúcar y de esta manera poder romper las cadenas de almidón para producir un substrato accesible (por ejemplo, glucosa). Por otro lado, la producción rápida de enzimas amilolíticas debe llevar a la licuefacción de dispersiones de almidón debido a que las cadenas de almidón se degradan rápidamente. Esta es una característica deseable para la producción de etanol a escalas industriales en los que la disponibilidad de

azúcar es a menudo la etapa limitante en la vía de reacción. Las levaduras, en particular *S. cerevisiae* es etiquetada, como generalmente reconocida como segura (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). La idea fundamental es que el panadero o cervecero puedan modificar gradualmente las propiedades de los gránulos de almidón a temperatura de sub-gelatinización con *S. cerevisiae* para hacer menos digerible el almidón.

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue evaluar los cambios estructurales de Almidón de Maíz durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Resultados y Discusión

La Figura 2.1 se presenta la curva de crecimiento del cultivo de *S. cerevisiae* a un tiempo final de 12 h de incubación. La cinética de crecimiento mostró un perfil típico de S, al emplear una función logística de ajuste. Se observa una fase de adaptación (fase lag) muy corta desde el inicio del inóculo hasta la primera hora de incubación, debido principalmente a la abundancia de nutrientes disponibles en el medio para el crecimiento de las levaduras.

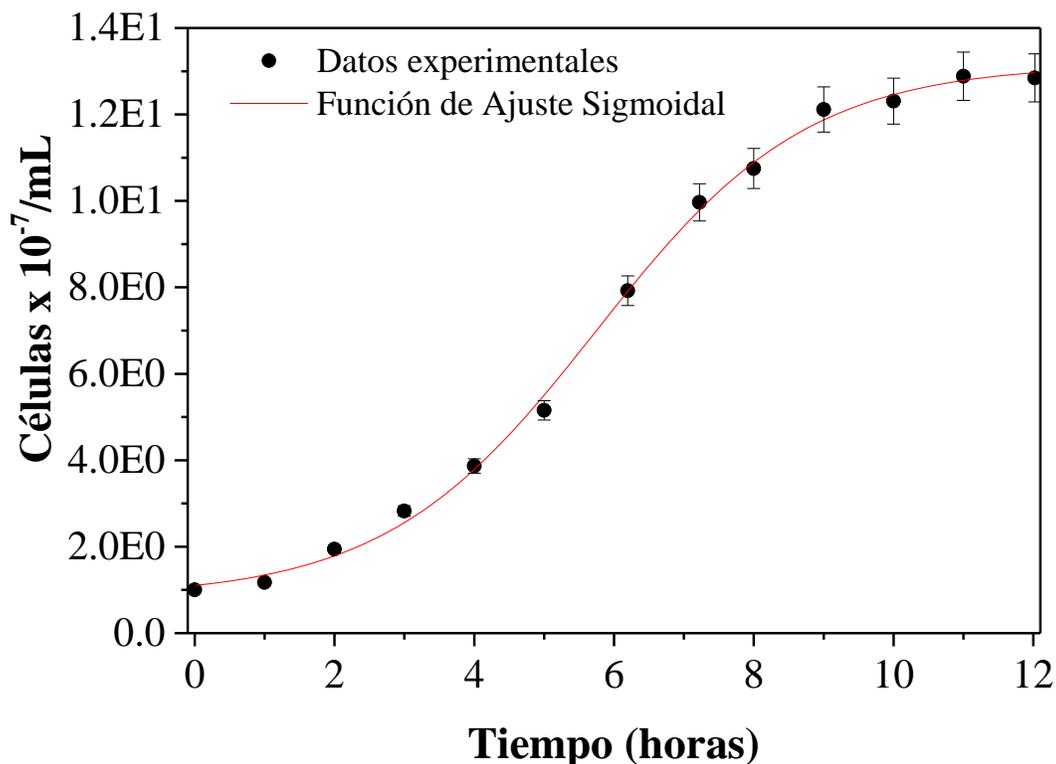


Figura 2.1. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* utilizada para la fermentación de gránulos de almidón de maíz.

La fase exponencial (fase log) en donde se incrementa el número de levaduras comienza a partir de la primera hora y hasta las 7 horas. Posteriormente, la fase estacionaria se presenta en *S. cerevisiae* a partir de las 7 horas en donde las levaduras comienzan un metabolismo diferente a la fase log para la acumulación y liberación de metabolitos secundarios (ejemplo., producción de enzimas) y concluye hasta las 12 horas debido al agotamiento de alguno de los nutrientes esenciales en el medio. Uno de los parámetros cinéticos determinados fue la tasa específica de crecimiento (μ) la cual fue de 0.33 h^{-1} . La población máxima de células de aproximadamente 13.0×10^7 células/mL. Las células se colectaron en la fase logarítmica tardía y se utilizaron para la inoculación de las dispersiones de almidón de maíz (3% p / v).

2.2.1. Morfología de los Gránulos de Almidón Fermentado

Las Figuras 2.2a-2.2e presentan imágenes de microscopía de luz polarizada de los gránulos de almidón de maíz a distintos tiempos de fermentación. El almidón nativo de maíz (AMN) (Figura 2.2a) exhibe una morfología típica elipsoidal, donde la cruz de Malta está claramente delineada. El almidón de maíz fermentado (AMF)_{24h} (Figura 2.2b) muestra que las fracturas aparecen alrededor de la cruz de Malta, cuya definición se comienza a perder, y se aprecia la erosión en la circunferencia de los gránulos. La figura 2.2c muestra el desarrollo de fracturas más profundas sobre la región de la cruz de Malta de los gránulos de AMF_{48h}. Este efecto morfológico no se puede atribuir al hinchamiento del gránulo ya que la fermentación se llevó a cabo a temperatura de sub-gelatinización (38 °C). Las imágenes de los gránulos de almidón (datos no mostrados) en la ausencia de *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones de tratamiento (tiempo, temperatura y agitación), no mostraron fracturas o daños severo como en la figura 2.2c.

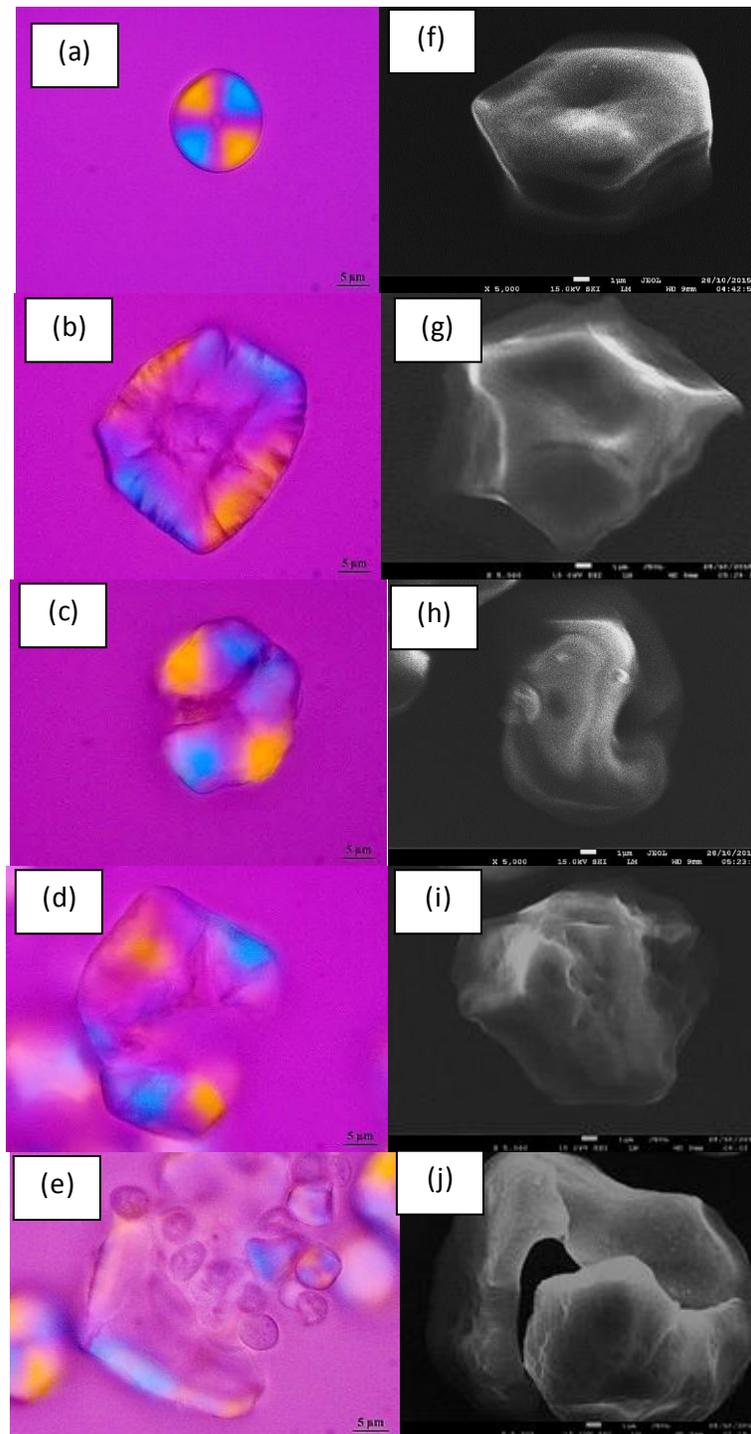


Figura 2.2. (a)-(e) Microscopia de luz polarizada y (f)-(j) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado (0, 24, 48, 96 y 120 h) con *S. cerevisiae*.

A medida que avanza el tiempo de fermentación, los gránulos de AMF_{96h} presentan un alto grado de deformación, perdiendo la integridad estructural, y la cruz de Malta ya no es apreciable (Figura 2.2d). Después de 120 h de fermentación, los gránulos de AMF_{120h} se fragmentaron completamente (Figura 2.2e). Las imágenes de SEM también permiten monitorear los cambios morfológicos inducidos por la fermentación con *S. cerevisiae* en los gránulos de almidón de maíz. La Figura 2.2f ilustra la forma de los gránulos de almidón de maíz (AMN) sin fermentar, se muestra una clara definición del *hilum* (es decir, el centro de organización) ligado a la cruz de Malta. La superficie de los gránulos es relativamente lisa y sin fracturas visibles o erosión. Los gránulos de AMF_{24h} aparecen como un balón desinflado (Figura 2.2g), y después de 48 h de fermentación (AMF_{48h}) se aprecian regiones con fracturas y erosiones (Figura 2.2h). En la Figura 2.2i se puede observar que la integridad de los gránulos de AMF_{96h} se vio fuertemente afectada presentando una mayor erosión y fracturas severas, llevando a la formación de una red porosa reflejada como pequeños orificios en la superficie de los gránulos. Se obtuvieron patrones de erosión similares para los gránulos de almidón de arroz sometidos a la acción amilolítica por las enzimas naturales del fermento de arroz (Zhang y col., 2016). La Figura 2.2j muestra que los gránulos AMF_{120h} se fragmentan. De hecho, la Figura 2.2j muestra un fragmento del gránulo que apareció como una cáscara de la estructura original. Los gránulos de almidón nativos son estructuras complejas formadas por las regiones de crecimiento semi-cristalinas y amorfas orientadas radialmente organizados por el *hilum*. Mientras que la mayor parte del gránulo de almidón parece ser una estructura sólida con superficie lisa, el *hilum* aparece comúnmente como una región relativamente desorganizada con algunas fracturas, mostrando la cruz de Malta, en las imágenes de luz polarizada. Las imágenes en la Figura 2.2 de manera general indican que la ruptura de gránulos por la acción fermentativa de *S. cerevisiae* comenzó

alrededor de las fracturas del *hilum*, que son la región menos organizada del gránulo de almidón nativo. Después de un período de adaptación, *S. cerevisiae* fue capaz de producir α -glucoamilasas que atacaron la región vulnerable situada alrededor de la cruz de Malta. Aunque la superficie de los gránulos también fue erosionada por la enzima amilolítica, las regiones de crecimiento amorfas dentro del cuerpo de los gránulos son más susceptibles a la degradación por α -glucoamilasas. La fractura que pasa a través del *hilum* en el gránulo de almidón nativo permite la difusión de las enzimas amilolíticas (Chen y col., 2006). Finalmente, a tiempos relativamente largos de fermentación, el gránulo de almidón se agrietó por abajo, dejando sólo una cáscara tipo nuez.

2.2.2. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)

La erosión y la fractura de los gránulos de almidón de maíz fermentado llevó a cambios importantes en su tamaño. Para evaluar estos cambios, se monitoreó el promedio de la longitud del diámetro (es decir, el diámetro lineal). Los resultados se muestran en la primera columna de la Tabla 2.1. El diámetro disminuyó a medida que el tiempo de fermentación aumentó como consecuencia de la erosión de la superficie y la fragmentación del gránulo inducida por las enzimas amilolíticas. La reducción de tamaño estuvo acompañada de grandes desviaciones estándar, lo que refleja la diversidad de la formación de estructuras granulares. Es importante señalar que las mayores desviaciones estándar ocurrieron dentro de un intervalo de tiempo de fermentación de aproximadamente 72 a 120 horas, lo que corresponde más o menos a las erosiones severas, fracturas y fenómenos de fragmentación observados alrededor de la región del *hilum* en las Figuras 2.2c-e.

Tabla 2.1. Cambios fisicoquímicos y morfológicos de gránulos de almidón de maíz producidos con *S. cerevisiae* a distintos tiempos de fermentación.

Tiempo de Fermentación (h)	$d_{1,0}$ (μm)	Cristalinidad (%)	Absorbancia-Relación 1047/1022	Potencial- ζ (mV)	Viscosidad a 1.0 s^{-1} (Pa s)	Hidrólisis Ácida (%)
0	17.31 \pm 0.73 ^a	32.82 \pm 1.50 ^d	0.68 \pm 0.06 ^a	-33.26 \pm 0.54 ^a	14.76 \pm 0.23 ^a	37.12 \pm 2.02 ^a
12	17.27 \pm 0.72 ^a	33.20 \pm 1.26 ^d	0.72 \pm 0.04 ^a	-35.55 \pm 0.47 ^b	13.21 \pm 0.35 ^a	31.92 \pm 1.75 ^b
24	17.12 \pm 0.81 ^a	37.99 \pm 1.65 ^c	0.69 \pm 0.03 ^{a, b}	-44.76 \pm 0.42 ^c	13.78 \pm 0.28 ^{a, b}	26.93 \pm 1.57 ^c
48	16.68 \pm 1.32 ^a	38.13 \pm 1.77 ^{b, c}	0.70 \pm 0.03 ^a	-45.75 \pm 0.32 ^c	12.23 \pm 0.26 ^b	23.72 \pm 1.62 ^d
72	16.06 \pm 1.65 ^{a, b}	39.28 \pm 1.56 ^a	0.69 \pm 0.04 ^a	-44.65 \pm 0.52 ^c	11.27 \pm 0.32 ^c	19.73 \pm 1.58 ^e
96	15.28 \pm 1.72 ^b	40.94 \pm 1.58 ^a	0.68 \pm 0.03 ^{a, b}	-42.65 \pm 0.68 ^{c, d}	9.65 \pm 0.35 ^d	17.56 \pm 1.38 ^f
120	14.51 \pm 1.86 ^b	39.14 \pm 1.49 ^{a, b}	0.66 \pm 0.03 ^{b, c}	-38.75 \pm 0.75 ^b	7.68 \pm 0.24 ^{d, e}	16.96 \pm 1.15 ^g
168	13.09 \pm 1.56 ^{b, c}	38.40 \pm 1.56 ^{b, c}	0.64 \pm 0.04 ^c	-37.93 \pm 0.65 ^b	6.97 \pm 0.24 ^e	16.98 \pm 0.93 ^h

Las medias (\pm desviación estándar) en una columna seguida de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

2.2.3. Cambios en la Cristalinidad Durante la Fermentación

En la Figura 2.3 se muestran los patrones de difracción de rayos-X. El almidón de maíz nativo mostró un patrón típico de difracción de rayos-X de *tipo A*, con picos principales a 15.12, 17.17, 18.05 y 23.0 grados- 2θ (Buléon y col., 1998). El almidón de maíz fermentado mostró el mismo patrón de difracción de rayos-X, lo que indica que la estructura cristalina del almidón no fue alterada por la acción fermentativa de *S. cerevisiae*.

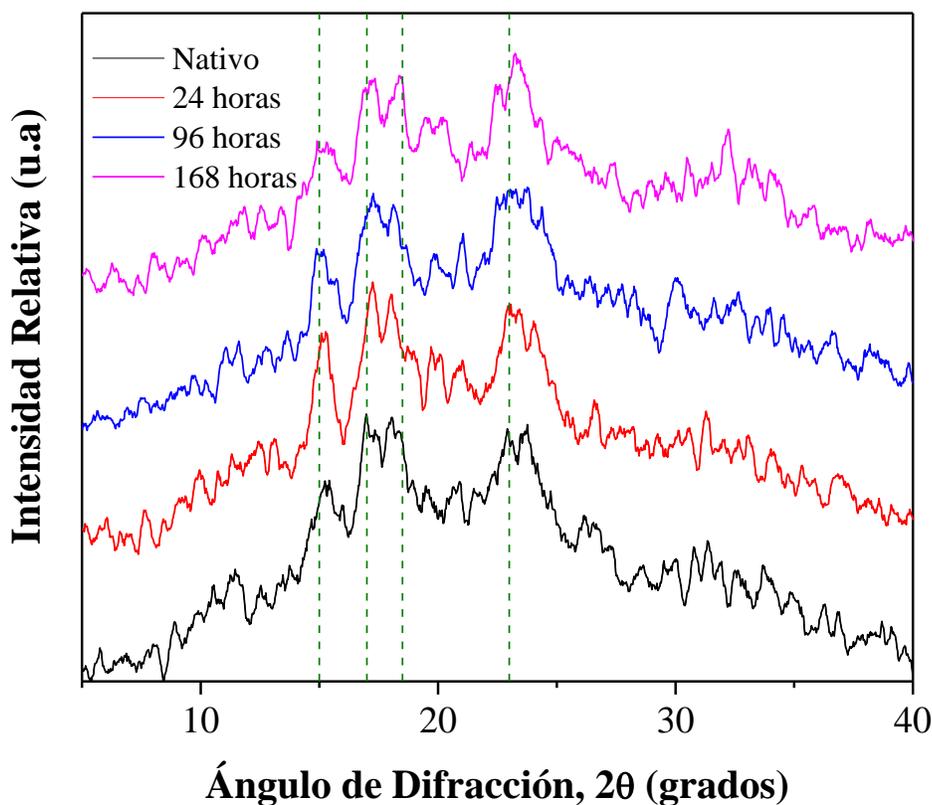


Figura 2.3. Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado (24, 96 y 168 h) con *S. cerevisiae*. Las líneas verticales indican picos característicos de cristalinidad *tipo-A*.

El cambio de la cristalinidad relativa del almidón de maíz nativo y del almidón de maíz fermentado se presenta en la segunda columna de la Tabla 1. La cristalinidad del AMN fue de aproximadamente 32.82 % y aumentó a un valor máximo para el almidón de maíz fermentado a 96 h y disminuyó al incrementar el tiempo de fermentación a 38.40 % después de 168 h de fermentación.

El aumento inicial en la cristalinidad con el tiempo de fermentación es compatible con el postulado de que las α -glucoamilasas producidas por *S. cerevisiae* que atacan preferentemente las regiones amorfas del gránulo de almidón. Resultados similares fueron reportados por Zhang y col. (2006), demostrando que la cristalinidad del almidón tratado con α -amilasa y amiloglucosidasa aumentó ligeramente. Asimismo, Li y col. (2013a) mostraron que las enzimas amilolíticas del fermento de arroz aumentan la cristalinidad del almidón. Se propone que, aunque la α -amilasa ataca simultáneamente regiones cristalinas y amorfas, esta última es más susceptible a la digestión amilolítica que la primera. Se ha señalado que *S. cerevisiae* es capaz de producir glucoamilasas (Genomes, 2013), que pueden hidrolizar los enlaces terminales 1,4-ligado α -D-glucopiranosil de los extremos no reductores y enlaces 1,6- α -D-glucósido en los puntos de ramificación de las moléculas de almidón. La actividad específica de la glucoamilasa hacia el enlace 1,4 es mucho mayor que para el enlace 1,6 (van Zyl y col., 2012). Las regiones amorfas de los gránulos de almidón están compuestas principalmente por las cadenas de amilosa y la región del punto de ramificación de cadenas de amilopectina. Las cadenas de amilosa se encuentran en la parte central del gránulo y entre las láminas de cristal. Por otro lado, las regiones cristalinas se componen de dobles hélices empaquetadas dentro de redes cristalinas (Blazek y Gilbert, 2011).

En la fase inicial de la fermentación, las regiones amorfas en las regiones centrales (es decir, *hilum*) fueron hidrolizadas por glucoamilasas, lo que conduce a la descomposición y fragmentación de los gránulos de almidón (Figura 2.2). Como consecuencia, los gránulos fracturados estaban más susceptibles a la hidrólisis enzimática de las regiones amorfas internas, dando lugar a un mayor contenido de cristalinidad. A largo plazo, después de aproximadamente 120 horas de fermentación, las regiones cristalinas se ven afectados también en gran medida por la fragmentación enzimática, que produjo una ligera disminución de la cristalinidad relativa. Se observó un patrón similar en el cambio de cristalinidad para la hidrólisis ácida del almidón de maíz (Utrilla-Coello y col., 2014) donde el H_2SO_4 (3.6 M, 35 °C) hidrolizó principalmente las regiones amorfas para lograr un contenido máximo de cristalinidad de aproximadamente 42.5 % dentro de los primeros 2-3 días de tratamiento. Blazek y Gilbert (2010) señalaron que la existencia de poros y canales granulares, así como la capacidad de penetración física del anillo de crecimiento amorfo afecta a la accesibilidad de la enzima al sustrato. La hidrólisis enzimática o ácida amplió la red porosa del gránulo (véase Fig. 2.2i), que a su vez mejoró el transporte del agente de hidrólisis, por lo tanto, aumentó la velocidad de fragmentación de las cadenas de almidón.

2.2.4. Análisis de Gránulos de Almidón por FTIR

En la Figura 2.4 se presentan los espectros de FTIR dentro de un intervalo de longitud de onda de 1200-900 cm^{-1} del almidón de maíz nativo y almidón de maíz fermentado. Las bandas de absorbancia de infrarrojo a 1047 cm^{-1} y 1022 cm^{-1} están vinculadas a estructuras de almidón cristalinas y amorfas, respectivamente.

De esta manera, la relación de absorbancia $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ se ha propuesto como un índice del orden de los dominios cristalinos y dominios amorfos en AMN y AMF. La tercera columna de la Tabla 2.1 presenta la variación de la relación de absorbancia $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ con el tiempo de fermentación. La relación de la absorbancia de almidón de maíz fermentado obtenido a 12 h mostró un incremento respecto al del almidón de maíz nativo, pero el almidón de maíz fermentado a 24 h indicó una disminución respecto al almidón de maíz fermentado a 12 h.

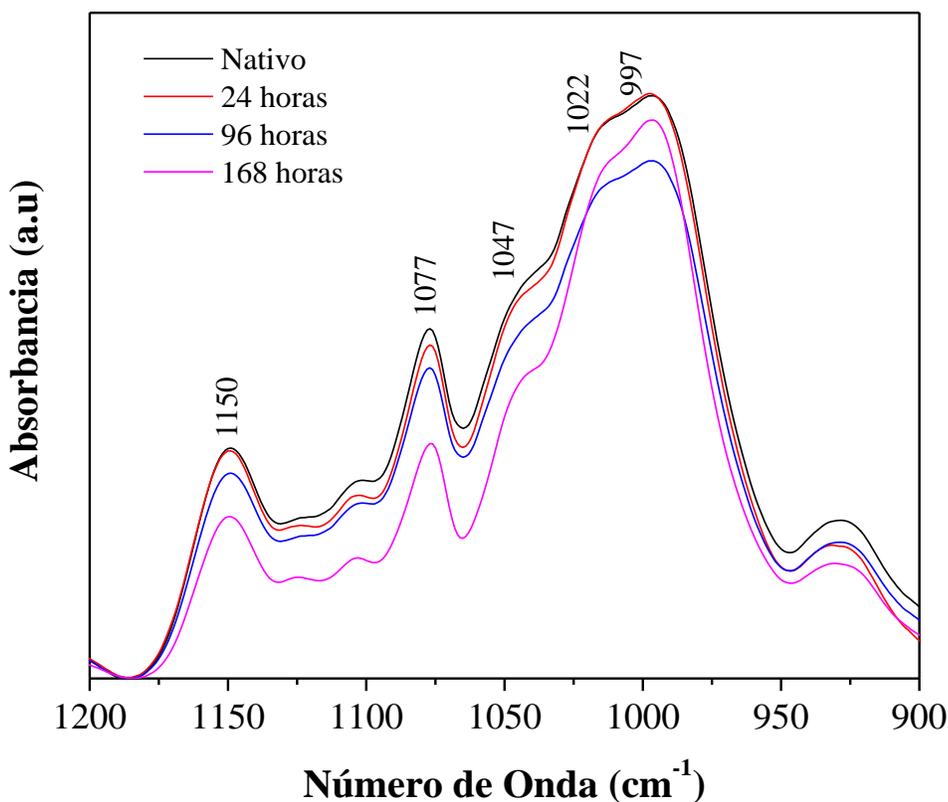


Figura 2.4. Patrones de difracción de FTIR de almidón de maíz nativo y fermentado (24, 96 y 168 h) con *S. cerevisiae*.

La relación de absorbancia permaneció estable aproximadamente en 0.69 hasta un tiempo de fermentación de 96 horas, mostrando una disminución constante en los tiempos de fermentación más largos, alcanzando un valor de 0.64 para el almidón de maíz fermentado a 168 h, que fue incluso menor que el presentado por el almidón de maíz nativo. Mientras que los patrones de difracción de rayos-X reflejan el orden de largo alcance del paquete cristalino, la relación de absorbancia $1047 \text{ cm}^{-1}/1.022 \text{ cm}^{-1}$ refleja principalmente el orden de corto alcance por las disposiciones de doble hélices.

Los resultados de la Tabla 2.1 indican que, en las primeras horas de la fermentación las enzimas amilolíticas producidas por *S. cerevisiae* fueron incapaces de destruir las estructuras de forma compacta de doble hélice, enfocándose principalmente en las cadenas lineales y ramificadas disponibles en las fracturas del *hilum*. A medida que la estructura del gránulo fue fuertemente desorganizada, las estructuras de doble hélice quedaron expuestas al ataque las α -glucoamilasas. El efecto se refleja como una importante disminución en la relación de la absorbancia del almidón de maíz fermentado a 120 h y 168 h.

2.2.5. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado

En la Figura 2.5. se presentan los patrones de flujo endotérmico de almidones nativos y fermentados. El almidón de maíz nativo mostró un pico de temperatura de gelatinización de aproximadamente $71.5 \text{ }^\circ\text{C}$, que está en el intervalo normal de valores reportados para el almidón de maíz (Yangcheng y col., 2013).

Las muestras de los gránulos de almidones fermentados fueron secadas en una estufa a 30 °C durante 24 h y colocadas en un desecador hasta alcanzar un peso constante, lo que significa que las muestras también contenían una población de cultivo de *S. cerevisiae*. Aunque la levadura es inactiva después del secado, tiene la habilidad de recuperarse bajo condiciones apropiadas. De esta forma, las levaduras presentan una respuesta térmica que se combina con la respuesta térmica de los gránulos de almidón.

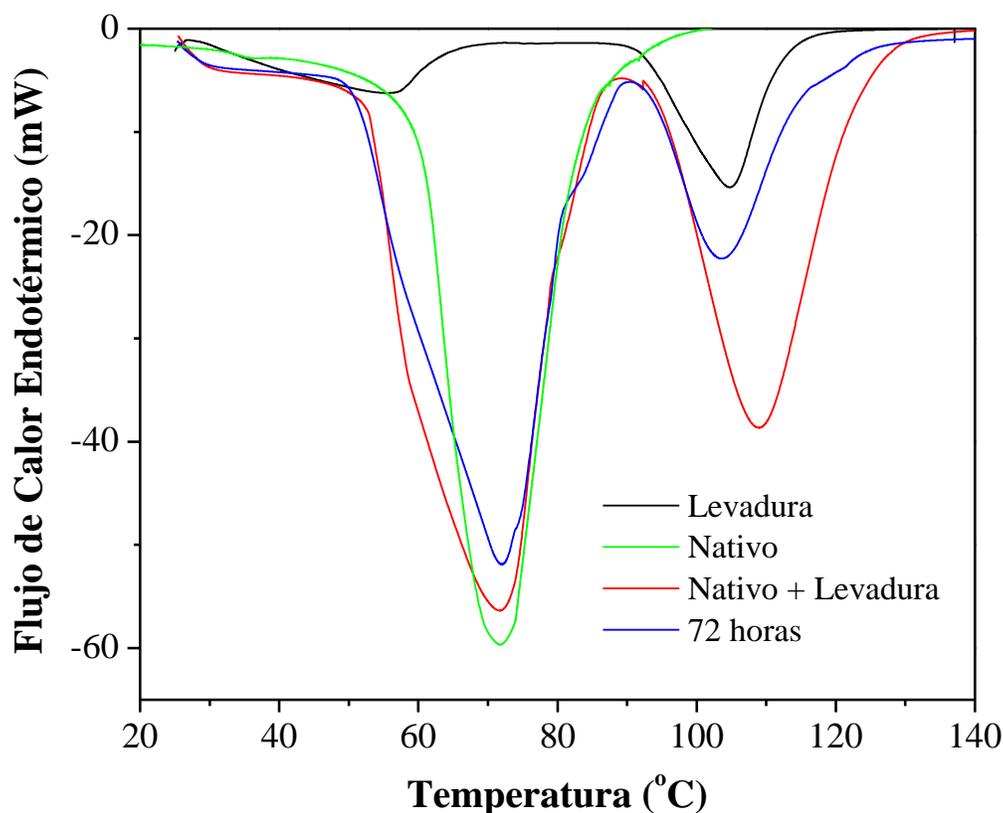


Figura 2.5. Patrones de flujo endotérmicos de levadura, almidón de maíz nativo, almidón de maíz nativo + levadura (0 h) y almidón de maíz fermentado (72 h) con *S. cerevisiae*.

El patrón de flujo endotérmico de la dispersión de levadura se presenta en la Figura 2.5, mostrando dos picos de temperatura en alrededor de 55.0 y 105.0 °C. El significado de estos picos no está claro en absoluto ya que las propiedades térmicas de dispersiones de levadura no se han estudiado de forma sistemática. El segundo pico podría estar relacionado con la lisis de *S. cerevisiae*, a partir de 90 °C y terminado en aproximadamente 105 °C. Por otra parte, el primer pico endotérmico podría estar relacionado con el proceso de activación-inactivación de *S. cerevisiae* como función de la temperatura.

Beney y col. (2000) encontraron un aumento lineal lento en la viabilidad de *S. cerevisiae* de 25 a 50 °C (no superior a 0.5 °C/min) permitiendo un incremento en la tolerancia térmica de la levadura a 50 °C. Además, el incremento de temperatura induce un rápido aumento de la mortalidad de la levadura. Es evidente que el primer pico endotérmico es el resultado de la activación de la levadura y posterior mecanismo de desactivación. Aunque se trata de una cuestión interesante que merece un análisis detallado, que está más allá del alcance de este trabajo. En la Figura 2.5 se presenta el patrón de flujo endotérmico para el almidón nativo mezclado con la levadura *S. cerevisiae*. La presencia de levadura modificó el patrón de flujo endotérmico, aunque la temperatura de pico de gelatinización no se vio afectada. La respuesta del extremo izquierdo se amplió por el primer pico en presencia de levadura, enmascarando de esta forma la temperatura de inicio. En conclusión, es interesante que la temperatura no se vea afectada ya que la temperatura de inicio del segundo pico de la levadura está más allá de la temperatura del ajuste final de la dispersión de almidón. Un cálculo apropiado de las propiedades térmicas debe considerar el efecto de la levadura contenida en la muestra de almidón seco. Sin embargo, no se logró determinar el número de células presentes durante la fermentación debido a lograr un conteo falso por estar presentes dentro de la estructura de los

gránulos de almidón de maíz. Las propiedades térmicas de las muestras del almidón nativo y fermentado se presentan en la Tabla 2.2.

Los resultados mostraron que el rango de temperatura de fusión T_c-T_o incrementó con el tiempo de fermentación. Lo que refleja que el almidón fermentado es más heterogéneo que el almidón nativo. La entalpía de gelatinización también aumentó con el tiempo de fermentación, indicado que la estructura de los gránulos de almidón residual es más ordenada que la del almidón nativo. A pesar de que, la entalpía de gelatinización mostró una ligera disminución después de 120 horas, lo que indica el deterioro del ordenamiento interno.

Utrilla-Coello y col. (2014) encontraron una relación parabólica entre la entalpía de gelatinización y la cristalinidad relativa para el almidón de maíz hidrolizado con H_2SO_4 (3.6 M, 35 °C). La fragmentación de los gránulos del almidón por el efecto del hidrólisis genera una gran cantidad de fragmentos granulares con una diversidad de estructuras cristalinas reflejándose en un intervalo de temperatura de gelatinización más amplio. A largo plazo, después de aproximadamente 120 horas, las estructuras se acomodaron por la acción adicional de enzimas amilolíticas en paquetes de doble hélices.

Tabla 2.2. Evolución de las propiedades térmicas de almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con *S. cerevisiae*.

Tiempo de Fermentación (horas)	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH (J/g)
Nativo	57.65±0.32 ^a	72.16±0.26 ^c	86.13±0.92 ^c	27.91±0.25	7.65±0.31 ^d
12	57.02±0.45 ^a	71.45±0.25 ^{b, c}	86.17±0.53 ^c	29.15±1.17	7.54±0.34 ^d
24	55.35±0.33 ^b	72.36±0.10 ^{b, c}	84.42±0.45 ^d	29.07±0.87	9.68±0.66 ^c
48	56.98±0.58 ^{a, b}	73.72±0.13 ^a	88.65±0.89 ^b	31.67±1.16	8.88±0.58 ^{c, d}
72	55.34±0.74 ^b	74.53±0.24 ^a	89.80±0.42 ^b	34.56±0.76	11.35±0.36 ^a
96	57.55±0.34 ^a	74.12±0.16 ^a	92.53±0.15 ^a	34.98±0.86	12.85±0.47 ^a
120	58.86±0.91 ^a	74.06±0.23 ^a	89.32±0.34 ^b	30.46±1.12	11.14±0.76 ^{a, b}
168	58.27±0.83 ^a	73.63±0.12 ^{a, b}	91.78±0.41 ^{a, b}	32.51±0.78	10.36±0.54 ^{b, c}

T_o, temperatura de inicio; T_p, temperatura de pico; T_c, temperatura final; ΔH, entalpía; ΔT (T_c-T_o), rango de temperatura de gelatinización.

Las medias (± desviación estándar) en una columna seguida de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

2.2.6. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas

La viscosidad aparente de dispersiones de almidón gelatinizados (5% p/v) como función de la tensión de cizallamiento para las muestras nativas y fermentadas se presenta en la Figura 2.6. La viscosidad aparente decayó con la velocidad de cizallamiento, lo que indica un comportamiento típico reductor de geles de almidón. Durante la gelatinización, las cadenas de amilosa y amilopectina se lixivian fuera de los gránulos, formando una matriz continua altamente viscosa.

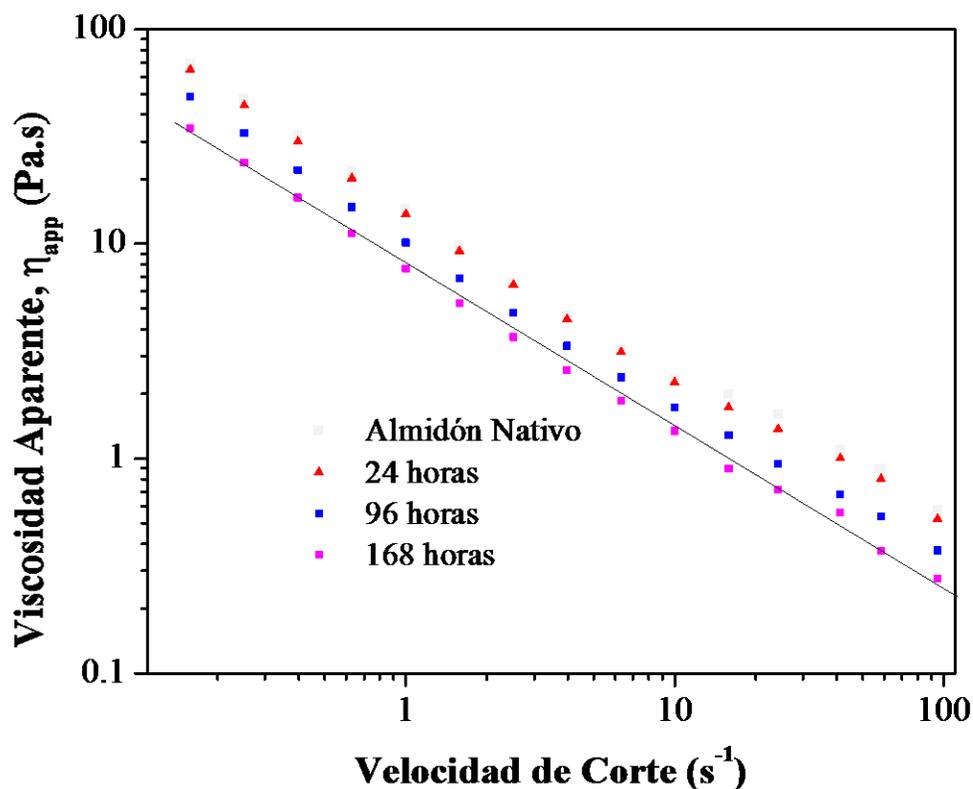


Figura 2.6. Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con *S. cerevisiae*.

Restos insolubles, también llamados fantasmas, se dispersan en la matriz continua, formando una microestructura con respuesta reológica compleja (Debet y Gidley, 2007). La viscosidad aparente exhibidas por las dispersiones de almidón gelatinizado depende en gran medida de la longitud de cadena y grado de ramificación de las cadenas de almidón lixiviado. En particular, la reducción de las cadenas cortas de amilosa afectan en gran medida la viscosidad de los geles de almidón (Zhang y col., 2013). Los resultados de la Figura 2.6 indican que la fermentación de *S. cerevisiae* afectó la configuración de las cadenas de almidón a través de la hidrólisis enzimática. Es decir, las enzimas amilolíticas condujeron a una fragmentación parcial de las cadenas de almidón, que a su vez produjeron geles más débiles con reducida viscosidad aparente.

2.2.7. Potencial- ζ

El almidón de maíz nativo presentó un potencial- ζ negativo de magnitud relativamente pequeña (alrededor de -17.2 mV). La adición de *S. cerevisiae* provocó un aumento en la magnitud del potencial alcanzando un valor de alrededor de -33.26 mV. Narong y James (2006) reportaron valores de potencial- ζ de alrededor de -12.0 mV para la levadura a pH 7. El potencial- ζ de las dispersiones refleja las propiedades químicas de superficie y la interacción entre las partículas. De esta forma, la diferencia de los valores de potencial- ζ para mezclas de dispersiones levadura-almidón indica interacciones electrostáticas débiles entre la levadura y los gránulos de almidón. En la Tabla 2.1 se presentan los valores de potencial- ζ de las dispersiones del almidón nativo y fermentado. A baja magnitud del potencial- ζ , hay una tendencia de las partículas de levadura para agregarse en colonias compactas (Narong y James, 2006).

En la primera etapa de la fermentación, las fuerzas de doble capa que se caracterizan en términos del potencial- ζ se incrementan para lograr un valor superior de aproximadamente -45.75 mV después de 48 horas, lo que sugiere que las partículas de levadura se desagregan para colonizar la superficie del gránulo de almidón. En las primeras etapas de la fermentación, los valores de potencial- ζ fueron incrementando hasta alcanzar un valor máximo de -45.75 mV después de 48 h de fermentación. Posteriormente, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación de 48, 72 y 96 h. De esta forma, las colonias compactas de la levadura se disgregaron cubriendo la superficie de los gránulos, esto les permitió alcanzar más fácilmente las fracturas de la cruz de Malta y causarles un mayor daño a los gránulos del almidón (Figura 2.2).

A tiempos más largos de fermentación (120-168h) se presenta un decremento significativo en los valores de potencial- ζ , esto pudo ser causado por un efecto de protección debido a las cargas superficiales positivas llevando a un incremento en la proliferación de estructuras fragmentadas y la formación de residuos.

2.2.8. Hidrólisis Ácida

Los resultados del avance de la hidrólisis ácida (HCl 1.0 M, 38 °C) después de dos horas se presentan en la Tabla 2.1. Los gránulos de almidón nativo presentan un avance de hidrólisis de aproximadamente el 37.12%, la cual disminuyó alrededor de 16.0-17.0% después de 120 horas de fermentación por *S. cerevisiae*. Este es un resultado esperado a partir de los resultados de cristalinidad que también se muestran en la Tabla 2.1.

De hecho, las estructuras cristalinas son menos susceptibles de ataque por digestión ácida y enzimática. Zhang y col. (2016) encontraron que la incubación con enzimas amilolíticas cambia las propiedades de digestibilidad de almidón de arroz por la disminución de la fracción del almidón de rápida digestión y el aumento de la fracción del almidón lentamente digerible. Los mecanismos de digestión de lado a lado (Zhang y Hamaker, 2009) afirman que los gránulos de almidón *tipo-A* contienen canales de conexión de la región central a la superficie del granulo. Cuando los gránulos de almidón son incubados por enzimas, estos agentes de hidrólisis migran a los gránulos de almidón a través de canales para iniciar la hidrólisis (preferentemente en regiones amorfas). La hidrólisis ácida limitada de almidón surgió como consecuencia de fragmentos de gránulos con una mayor cristalinidad y porosidad reducida. Bajo estas condiciones, la tasa de hidrólisis ácida está limitada por el transporte de protones dentro de la estructura del almidón.

2.3. Conclusiones

En este trabajo se estudió el empleo de la cepa *S. cerevisiae* para la modificación de la microestructura de gránulos de almidón de maíz. La idea fundamental es que *S. cerevisiae* se limita a la lenta tasa de producción de α -glucoamilasa de tal manera que la hidrólisis de las cadenas de almidón puede llevarse a cabo bajo condiciones controladas.

Una ventaja adicional con respecto a las enzimas industriales se basa en los costos ya que las cepas de *S. cerevisiae* están disponibles comercialmente en todas partes a precios económicos.

Los gránulos de almidón incubados fueron analizados con métodos de FTIR, XRD y DSC para demostrar que las enzimas amilolíticas de *S. cerevisiae* hidrolizan preferentemente las regiones amorfas de gránulos de almidón, generando un mayor contenido de cristalinidad y la disminución de la sensibilidad a hidrólisis ácida estricta.

Estas características también se reflejaron en la viscosidad aparente de dispersiones de almidón gelatinizado, que mostró una disminución de un 50 % después de 120 horas de fermentación.

En general, los resultados presentados en este trabajo sugieren que el uso de cepas de levadura estándar es una manera viable para modificar la microestructura de gránulos de almidón orientados a la digestibilidad y la viscosidad de las pastas de almidón.

Capítulo Tres

Transformaciones de Almidón de Maíz Durante la Fermentación Ácido Láctica con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Resumen

Desde la antigüedad, los alimentos han sido conservados por fermentación ácido láctica (FAL) incluyendo cerveza, productos lácteos, frutas, verduras y matrices de alimentos con almidón por ejemplo cereales, legumbres y tubérculos. El almidón es la fuente más importante de energía para los seres humanos. La amilosa y la amilopectina son microestructuras que estructuran al almidón, son las responsables del cambio de la modificación del almidón en los alimentos. En consecuencia, una comprensión precisa de las transformaciones fisicoquímicas sufridas por el almidón durante la FAL debe proporcionar información valiosa para el procesamiento adecuado de matrices de alimentos. En este trabajo, fueron inoculadas dispersiones de almidón de maíz nativo (AMN) (3% p/p) con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (2×10^7 células mL⁻¹) y sometidas a fermentación por 24 h a 38 °C. Las transformaciones fisicoquímicas en los gránulos de almidón fueron monitoreadas durante el tiempo de fermentación por XRD, FTIR, y DSC. El contenido de cristalinidad alcanzó un valor máximo (39.72 ± 1.02) después de 12 h de fermentación. Por el contrario, la relación de absorbancia 1047/1022 de las mediciones de FTIR aumentó a medida que avanzó la fermentación, lo que indica un incremento en la cristalinidad de corto alcance. Igualmente, el análisis de DSC mostró que la entalpia de gelatinización también aumentó aproximadamente 60.0% después de 12 h de fermentación, reflejando la producción de microestructuras ordenadas. Los gránulos de almidón de maíz fermentados fueron menos susceptibles a la hidrólisis ácida (HCl, 1.0 N, 38 °C) en comparación con los gránulos de AMN. A medida que aumentó el tiempo de FAL, los gránulos de almidón de maíz fueron menos susceptibles a la hidrólisis ácida. Por lo tanto, se concluye que la FAL aumentó el contenido de almidón resistente en gránulos de almidón de maíz.

Palabras clave: Almidón de maíz, Cristalinidad, Fermentación ácido láctica, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y Cambios estructurales

3.1. Introducción

La fermentación ácido láctica (FAL) es hoy en día uno de los procesos más importantes en la industria alimentaria. Su atractivo depende de la amplia diversidad de consorcios microbianos para la producción de ácido láctico de manera natural y cepas modificadas genéticamente, así como la facilidad de operación del proceso subyacente. Por otra parte, la mayoría de las bacterias ácido lácticas se etiquetan como generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). La FAL está implicada en el procesamiento y conservación de productos lácteos, vegetales y frutas, así como en la producción de pan vía fermentación de masa fermentada (Leroy y De Vuyst, 2004). La lista de aplicaciones y el uso de bacterias ácido lácticas es amplia y diversa. Los productos lácteos fermentados con propiedades funcionales mejoradas con beneficios potenciales para la salud humana han sido tradicionalmente producidos por FAL (Shiby y Mishra, 2013). Recientemente, Di Cagno y col. (2013) señaló que la FAL representa la forma más fácil y adecuada para aumentar el consumo diario de verduras y frutas frescas. La idea principal es combinar los métodos antiguos de bio-conservación con nuevos conocimientos biotecnológicos con el fin de mejorar las propiedades nutricionales, sensoriales, de seguridad y la vida útil de las frutas y verduras. La FAL también se utiliza para la producción a gran escala de ácido láctico, que se considera como un producto básico para la producción de sub-productos en las industrias alimentaria, química, cosmética y farmacéutica (Abdel-Rahman y col., 2013; Datta y Henry, 2006; Yang y col., 2016). Las bacterias ácido lácticas se utilizan para conservar los materiales alimenticios comestibles a través de la fermentación de otras materias primas tales como vino o cerveza de arroz, panes de arroz y pescado produciendo ácidos orgánicos para controlar microorganismos putrefactos y patógenos (Rhee y col.,

2011). Las bacterias ácido lácticas son comúnmente utilizadas en la fermentación de matrices biológicas que contienen una gran cantidad de almidón. Los residuos de almidón se utilizan cada vez con mayor frecuencia para la producción de ácido láctico (Castillo Martínez y col., 2013; Reddy y col., 2008). Se ha demostrado que el uso de masas fermentadas mejora la calidad del pan a base de maíz haciendo que la masa sea más cohesiva, suave y menos elástica mediante las modificaciones de las propiedades del gránulo de almidón (Falade y col., 2014). La modificación de las propiedades del almidón por FAL desempeña un papel importante en el mejoramiento de los atributos funcionales de los alimentos de cereales tradicionales (Díaz-Ruiz y col., 2003; Omar y col., 2000; Rhee y col., 2011). También se ha demostrado que la fermentación de masa reduce la reacción glucémica al pan (Scazzina y col., 2009). A pesar del amplio uso industrial y tradicional de la FAL para la conservación del procesamiento de matrices de alimentos que contienen grandes cantidades de almidón (por ejemplo, cereales y frutas), los análisis detallados de las transformaciones de gránulos y moléculas de almidón son aún poco comunes. Velikova y col. (2016) encontraron evidencia de que las bacterias ácido amilolíticas contienen un grupo básico de genes cromosómico para la hidrólisis del almidón. En este escenario, la síntesis de glucógeno y la degradación del almidón ocurren en paralelo. Alonso-Gomez y col. (2016) estudiaron los cambios fisicoquímicos que se presentan en la fermentación de la yuca a tiempos que varían de 15 a 90 días a temperatura ambiente. Se recolectaron muestras de yuca de un local en Colombia. Los inóculos contenían una diversidad grande e incontrolada de bacterias lácticas, incluyendo *Bifidobacterium inimum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus panis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc citreum*. Se encontró que el proceso de acidificación presentó cambios estructurales significativos en

amilosa y amilopectina en función del tiempo de remojo. Parada y Aguilera (2011) establecieron que debido a que el almidón está presente en muchos productos derivados de cereales, tubérculos y legumbres, algunos de estos productos pueden tener diferentes efectos metabólicos (por ejemplo, cambio de concentración de glucosa en sangre). Es necesario comprender la microestructura de los almidones para evaluar la relación que existe con el problema del índice metabólico y el efecto que tienen los almidones en las modificaciones ocurridas durante el procesamiento de alimentos en la digestibilidad.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las transformaciones fisicoquímicas sufridas por gránulos de almidón de maíz durante la fermentación del ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

3.2. Resultados y Discusión

En la Figura 3.1 se presenta la curva de crecimiento de *L. bulgaricus* en medio MRS después de 24 h de incubación. La cinética de crecimiento se ajustó a un modelo logístico (función de ajuste sigmoidea) mostrando un patrón en forma de S indicado de rojo en la Figura 3.1, con una fase de adaptación (fase lag) de aproximadamente 2 h. La población de células máxima fue de 2.5×10^8 células mL^{-1} . Los lactobacilos fueron cosechados en la fase log y se utilizaron para inocular las dispersiones de almidón de maíz (3% p/p). Se observa que la fase logarítmica se logró después de aproximadamente 10-12 h de tiempo de fermentación, lo que sugiere que la FAL debe realizarse durante al menos este período.

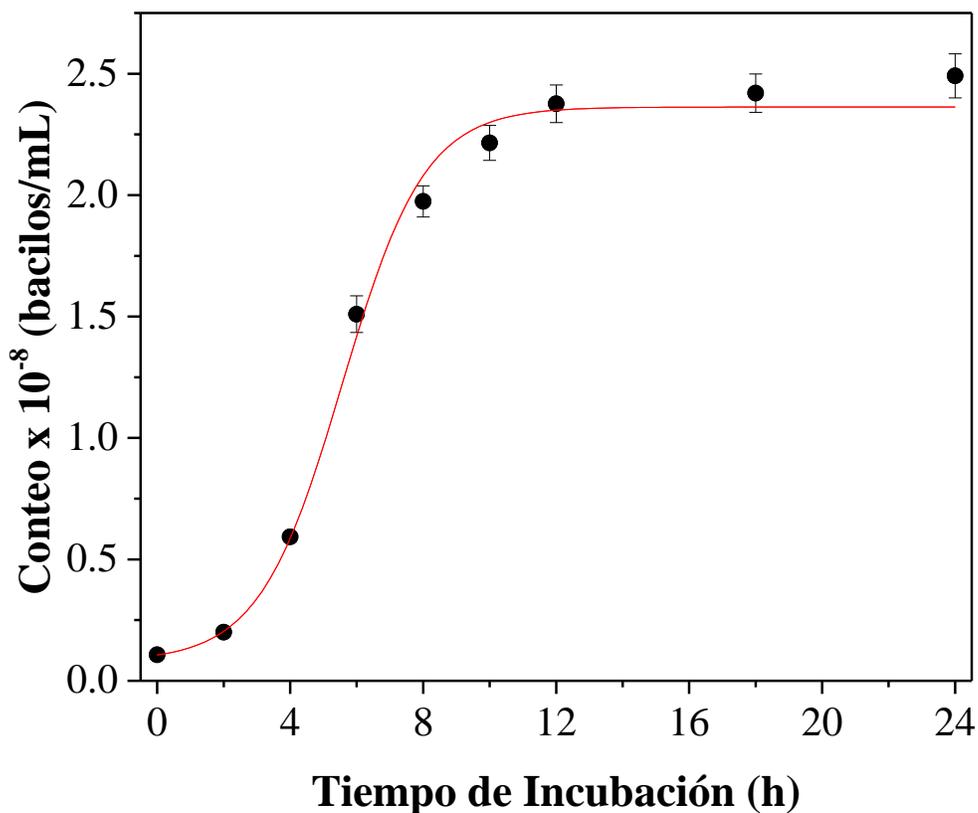


Figura 3.1. Cinética de crecimiento de *L. bulgaricus* en medio MRS.

3.2.1. pH y Producción de Ácido Láctico

En la Figura 3.2 se presenta la variación del pH con el tiempo de fermentación. Comenzando en aproximadamente 5.1, el pH mostró una disminución de tipo exponencial hasta alcanzar un valor constante de aproximadamente 3.4 después de 12 h de tiempo de fermentación. Este comportamiento está en línea con la cinética de crecimiento de la Fig. 3.1, donde se alcanzó la meseta de crecimiento a aproximadamente 10-12 horas. La disminución del pH fue causada por la producción de ácido láctico, que es el principal producto de la fermentación de *L. bulgaricus*.

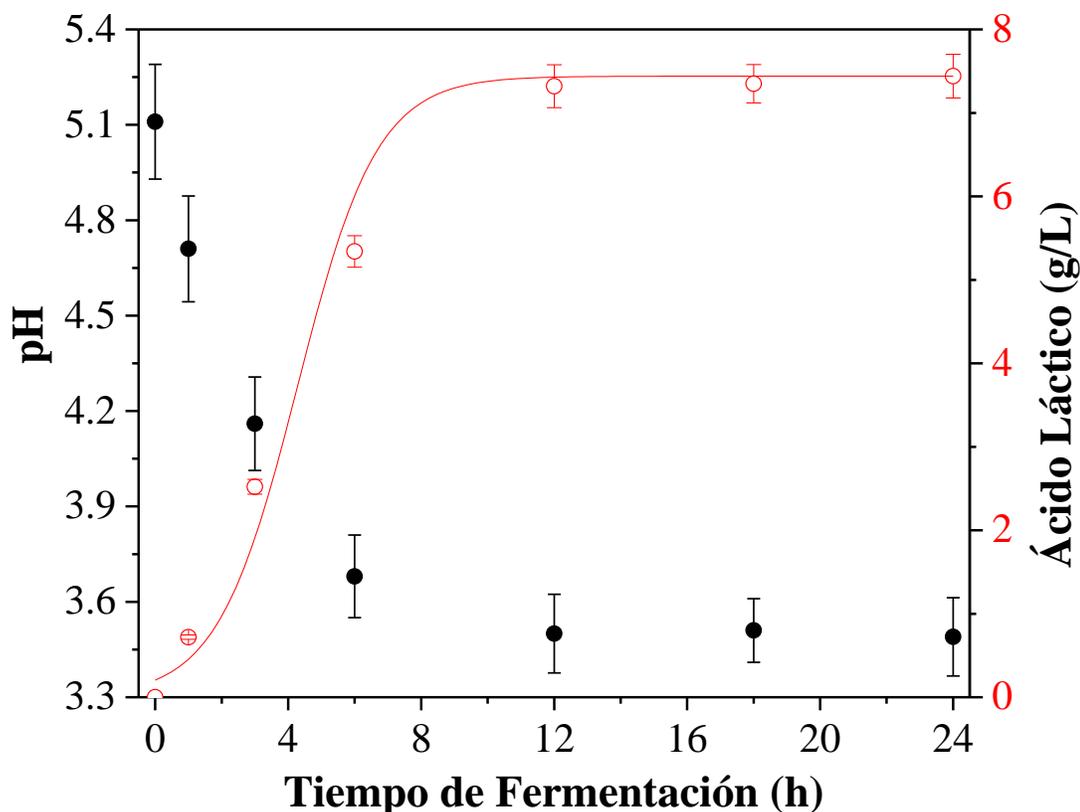


Figura 3.2. Evolución de la concentración de pH y ácido láctico con el tiempo de fermentación.

La Figura 3.2 muestra también la cinética de la concentración de ácido láctico, que presentó un patrón en forma de S con una pequeña fase lag de aproximadamente 1 h. Se observa que la producción de ácido láctico se alineó con la disminución del pH. La presencia del ácido láctico en el medio de fermentación debe tener un efecto importante en las transformaciones de los gránulos de almidón. De hecho, el ácido láctico provoca una débil hidrólisis de cadenas poliméricas de carbohidratos a la temperatura de fermentación operativa. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido láctico puede hidrolizar cadenas de quitosano en condiciones suaves (Irina y Varlamov, 2004). Sin embargo, aún faltan estudios sobre la hidrólisis de las cadenas de almidón por ácido láctico.

3.2.2. Morfología

En la Figura 3.3a se presenta una imagen de microscopía óptica de gránulos de AMN recién inoculados con *L. bulgaricus*. Los gránulos de AMN fueron teñidos con yodo para destacar su morfología. Los gránulos de almidón tenían una forma poligonal con el *hilum* en el centro del gránulo. Algunos de los lactobacilos se pueden ver unidos a la superficie de los gránulos AMN. Imam y Harry-O'Kuru (1991) indicaron que la fijación de lactobacilos a los gránulos de almidón implica la unión de enlaces hidrógeno. Esta adhesión parece tener correlación con el contenido de amilosa en la superficie del gránulo que es de naturaleza hidrófila. Como las enzimas amilolíticas no son secretadas extracelularmente, la unión de la membrana celular bacteriana a la superficie del gránulo de almidón, permite el paso de amilosa a través de la membrana celular externa en los dominios de reacción enzimática. Las Figuras 3.3b-3.3d de las imágenes de microscopía óptica ilustran el avance de las transformaciones morfológicas sufridas por los gránulos de almidón a medida que transcurre el tiempo de fermentación.

Después de 3 horas, justo después de la fase de adaptación (Fig. 3.3b), se incrementa la población de lactobacilos alrededor de los gránulos de almidón. La Figura 3.3.c muestra que después de 6 h muchos lactobacilos han invadido el *hilum* de un gránulo de almidón. El *hilum*, un centro de organización vinculado a la cruz de Malta, es un punto externo frágil que se conecta con la estructura interna de los gránulos. La unión de los lactobacilos a la región del *hilum* marca el comienzo de la ruptura de la estructura del gránulo por la acción de las enzimas amilolíticas producidas por los lactobacilos. La Figura 3.3e ilustra la ruptura de los gránulos de almidón después de un tiempo de fermentación de 18 h. Las fracturas aparecen alrededor de la cruz de Malta, cuya definición empieza a tener un aspecto borroso, y se observa erosión en la circunferencia del gránulo. Las enzimas amilolíticas (principalmente, α -amilasa) producidas por los lactobacilos unidos erosionan la región externa alrededor de la cruz de Malta para penetrar la estructura interna a través del *hilum*. Después, la descomposición del gránulo se convirtió en una consecuencia de la degradación de los anillos de las cadenas de almidón amorfo más internos. Se recuerda que, bajo la tinción con yodo la amilosa alcanza un color azul mientras que la amilopectina es de color amarillo. Las Figuras 3.3b-3.3d mostraron que la hidrólisis amilolítica atacó predominantemente las cadenas de amilosa. Esto se esperaba ya que la amilosa está compuesta principalmente por cadenas lineales, mientras que la amilopectina son moléculas ramificadas. Después de 18 h, el color amarillo relacionado con las cadenas de amilopectina domina el patrón en las imágenes de microscopía óptica. Las imágenes de SEM permitieron un seguimiento más detallado de los cambios morfológicos inducidos por la fermentación de lactobacilos en los gránulos de almidón de maíz. La Figura 3.3e ilustra la morfología (5000x) del gránulo de AMN, mostrando una superficie lisa que no ha sido afectada por la degradación enzimática.

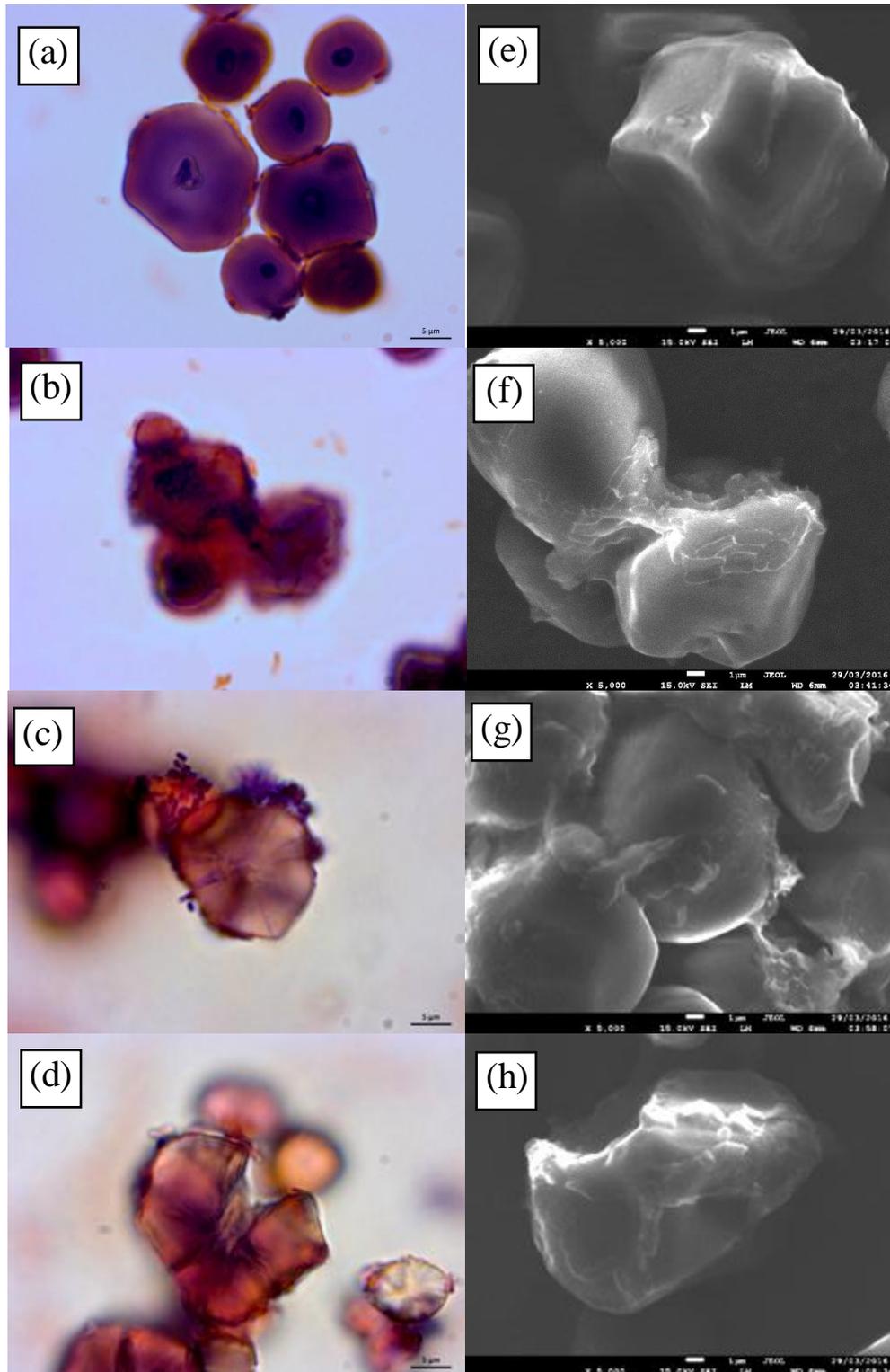


Figura 3.3. (a)-(d) Microscopía óptica y (e)-(h) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo y fermentado (0, 3, 6 y 18 h) con *L. bulgaricus*.

Los gránulos fermentados aparecieron como un globo desinflado a las 3 h de fermentación ácido láctica (Fig. 3.3f) y se aprecian regiones fracturadas y erosionadas a las 6 h de fermentación (Fig. 3.3g). La desorganización de la integridad de los gránulos de almidón se promovió a un tiempo posterior a las 18 h de fermentación ácido láctica, generando una erosión severa y fracturas (Fig. 3.3h). A su vez, esto condujo a la formación de una red porosa cerca de la región del *hilum* (Fig. 3.3d). Se observa un aspecto exfoliado de la superficie del gránulo, probablemente inducido por la acción combinada del ácido láctico y las enzimas amilolíticas producidas por las poblaciones de lactobacilos. Las imágenes que se presentan en la Figura 3.3 se ilustran los mecanismos involucrados en la ruptura de la integridad del gránulo de almidón de maíz. Los gránulos nativos de almidón están formados por regiones semi-cristalinas orientadas radialmente y anillos de crecimiento amorfo organizados alrededor del *hilum*. El gránulo de almidón es una estructura estable y la región del *hilum* se muestra desorganizada con algunas fracturas. Las imágenes de la Figura 3.3 reflejan que la ruptura del gránulo por la acción fermentativa de los bacilos comenzó alrededor de las fracturas del *hilum*. Después de un periodo de adaptación durante la fase lag, la población de lactobacilos creció y fue capaz de producir enzimas amilolíticas que atacaron la región vulnerable situada alrededor de la cruz de Malta. A pesar de que la superficie del gránulo también fue erosionada por las enzimas amilolítica, las regiones de crecimiento amorfo dentro de la estructura del gránulo son más susceptibles a la degradación por enzimas amilolíticas. La fractura que atraviesa el *hilum* permite la difusión de ácido láctico y enzimas amilolíticas (Chen y col., 2006). Finalmente, después de aproximadamente 12 h, los gránulos de almidón se agrietaron, dejando una estructura en gran parte rota y amorfa. La acción fermentativa de *L. bulgaricus* es más lenta que la acción por la aplicación directa de enzimas

amilolíticas descrito en la literatura. Shrestha y col., (2012; 2015) reportaron que un 90 % de almidón hidrolizado puede ser obtenido a un tiempo de 8 h mediante el empleo de enzimas amilolíticas de forma directa. Por otra parte, las erosiones superficiales y porosas controladas por difusión son los mecanismos dominantes implicados en la degradación de gránulos de almidón por actividad amilolítica (por ejemplo, amilasa) (Shrestha y col., 2012).

3.2.3. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)

La acción fermentativa condujo a cambios importantes en el tamaño de gránulos de almidón. En realidad, las fracturas y la erosión superficial deberían reducir el tamaño medio de los gránulos de almidón. Este efecto se evaluó mediante la monitorización del diámetro medio de longitud numérica (es decir, el diámetro lineal) y los resultados se presentan en la primera columna de la Tabla 3.1. Como era de esperarse, $d_{1,0}$ disminuyó con el tiempo de fermentación, que es una consecuencia directa de la erosión superficial y la fragmentación de gránulos inducida por la actividad de las enzimas amilolíticas. También se observa que la reducción del tamaño del granulo fue acompañada por desviaciones estándar cada vez mayores, lo que a su vez refleja una diversidad de formaciones estructurales granulares.

3.2.4. Cambios en la Cristalinidad

Los patrones de difracción de rayos-X para los diferentes tiempos de fermentación son ilustrados en la Figura 3.4. El AMN presenta un patrón de XRD de *tipo-A*, con picos de intensidad en 15.12, 17.17, 18.05 y 23.0 a 2 θ -grados (Buléon y col., 1998). Los gránulos de AMF_x presentan también este patrón de cristalinidad lo que sugiere que la estructura cristalina del almidón no fue alterada por la acción fermentativa de la población de lactobacilos. El

contenido de cristalinidad de los gránulos de almidón nativo y fermentado se presenta en la segunda columna de la Tabla 3.1. La cristalinidad del AMN fue de aproximadamente de 32.88%. En las primeras 3-6 h, el proceso de fermentación aumentó el contenido de cristalinidad hasta un valor máximo de aproximadamente 39.44%. A tiempos de fermentación más prolongados, el contenido de cristalinidad mostró una ligera disminución.

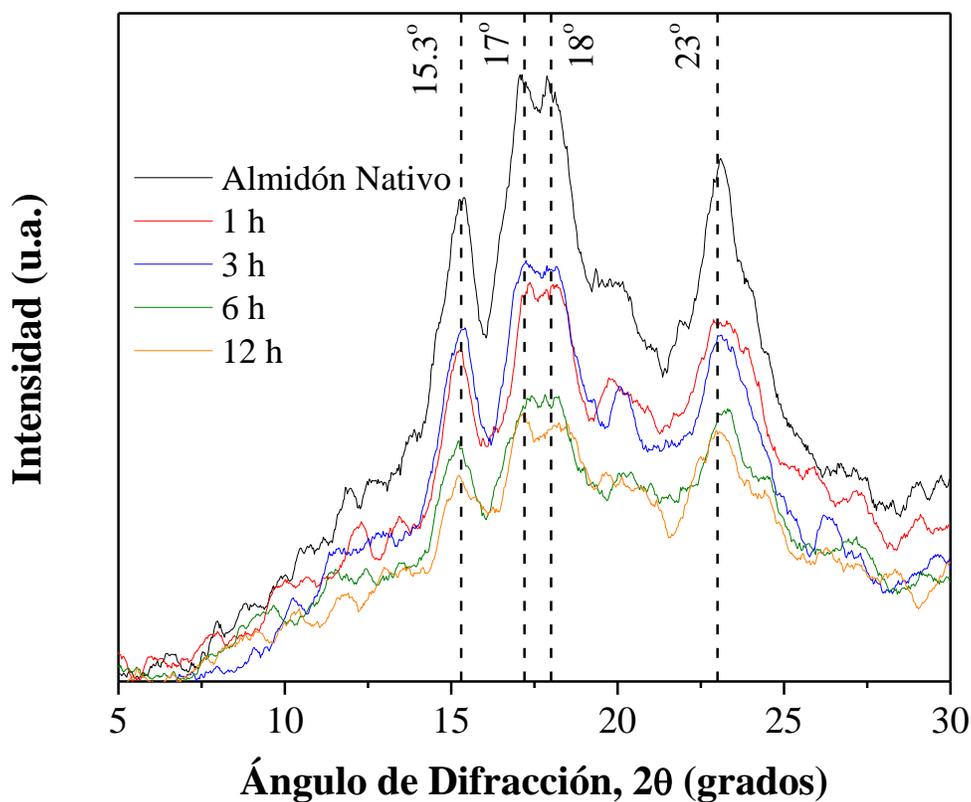


Figura 3.4. Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado con *L. bulgaricus*. Las líneas verticales denotan picos distintivos de cristalinidad de tipo-A.

Un efecto como este se observó para la hidrólisis de ácido sulfúrico (Utrilla-Coello y col., 2014), lo que sugiere que el aumento inicial de la cristalinidad está ligado al ataque preferido de las regiones amorfas de los gránulos de almidón por las enzimas amilolíticas producidas por la población de lactobacilos. Aunque la α -amilasa ataca ambas regiones cristalinas y amorfas, esta última región es más susceptible a la digestión amilolítica que la anterior (Shrestha y col., 2012). Además, la formación de poros y canales mejora la penetrabilidad física de las enzimas en las regiones amorfas de los gránulos de almidón. El efecto combinado de la hidrólisis enzimática y ácida amplía la red porosa del gránulo (Fig. 3.3c y 3.3d), lo que conduce a una mayor velocidad de fragmentación de la cadena de almidón. Zhang y col. (2006) reportan resultados similares para el almidón tratado con α -amilasa y amilogucosidasa, donde la cristalinidad mostró un ligero aumento durante el periodo de hidrólisis inicial. Similarmente, Li y col. (2013) encontraron que las enzimas amilolíticas (amilasa y glucoamilasa) obtenidas a partir de levadura de arroz aumentaron la cristalinidad, la capacidad de retención de agua y una alta porosidad del almidón de arroz para su posible uso como absorbente.

3.2.5. Análisis de los Gránulos de Almidón por FTIR

Se exploraron las bandas de absorbancia a 1047 y 1022 cm^{-1} vinculadas a las estructuras cristalinas y amorfas respectivamente del almidón. La relación de absorbancia 1047 cm^{-1} / 1022 cm^{-1} se toma comúnmente como el índice de los dominios cristalinos ordenados a dominios amorfos en almidón. La tercera columna de la Tabla 3.1 muestra la relación de absorbancia de 1047 cm^{-1} / 1022 cm^{-1} en función del tiempo de fermentación. La relación de absorbancia se mantuvo casi inalterada durante las primeras 12 h, mostrando una disminución

de este parámetro a mayores tiempos de incubación. Este resultado está estrechamente relacionado con el contenido de cristalinidad estimado a partir del patrón de rayos-X. Los resultados de rayos-X reflejan el ordenamiento a largo alcance de la cristalinidad y la relación de absorbanza de $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$ refleja el orden de corto alcance mediante arreglos de doble hélice.

Los resultados en la Tabla 3.1 sugieren que, en el primer periodo de 12 h, las enzimas amilolíticas producidas por la población de lactobacilos hidrolizan las regiones amorfas de los gránulos de almidón, dejando intactas las disposiciones de doble hélice. En el punto medio del periodo de fermentación, la cristalinidad a largo alcance consiguió un valor máximo a medida que se redujo el número de regiones amorfas. La ruptura gradual de la estructura de gránulos a tiempos de fermentación prolongados expuso las regiones cristalinas a la acción combinada de las enzimas amilolíticas y el ácido láctico, produciendo la reducción del porcentaje de cristalinidad. En este proceso, el contenido de doble hélice fue afectado positivamente, destacando un incremento del contenido de cristalinidad de corto alcance.

Tabla 3.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos con el tiempo de fermentación.

Tiempo de Fermentación (h)	$d_{1,0}$ (μm)	Cristalinidad (%)	Absorbancia Relación 1047/1022	Potencial- ζ (mV)	Viscosidad a 1.0 s ⁻¹ (Pa·s)	Hidrólisis Ácida (%)
Nativo	17.31±0.67 ^a	32.88±2.12 ^c	0.64±0.03 ^e	-15.12±0.67 ^d	8.48±0.34 ^a	36.96±1.43 ^a
1	16.28±0.76 ^{ab}	33.73±1.24 ^c	0.64±0.02 ^e	-21.43±0.75 ^c	6.83±0.27 ^b	28.78±1.65 ^b
3	13.35±0.78 ^b	39.44±1.13 ^a	0.65±0.03 ^d	-23.71±0.83 ^b	4.40±0.35 ^c	25.83±1.73 ^c
6	10.74±0.96 ^c	35.72±1.02 ^b	0.67±0.03 ^c	-25.27±0.81 ^{ab}	3.50±0.24 ^{cd}	19.18±1.42 ^d
12	7.08±1.90 ^d	32.84±0.95 ^c	0.72±0.04 ^b	-30.25±0.91 ^a	2.98±0.14 ^d	15.98±1.59 ^e
18	6.57±1.72 ^d	31.26±0.87 ^d	0.76±0.04 ^a	-30.12±0.87 ^a	2.73±0.16 ^d	12.83±1.43 ^{ef}
24	6.07±1.13 ^d	32.02±0.96 ^{cd}	0.78±0.03 ^a	-28.68±0.96 ^a	2.64±0.17 ^{de}	9.37±1.21 ^f

Las medias (\pm desviación estándar) en una columna seguida de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

3.2.6. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado

Las propiedades térmicas de los gránulos de almidón hidrolizados se estimaron mediante mediciones de DSC y los resultados se muestran en la Tabla 3.2. El rango de temperatura de fusión $T_c - T_o$ se incrementa con el tiempo de fermentación, reflejando que los gránulos de AMF exhiben una estructura más heterogénea que los AMN, lo cual es deseable para el procesamiento de alimentos ya que se generan gránulos de AMF termorresistentes por lo tanto su temperatura de funcionamiento es más alta que los gránulos de AMN. Por otra parte, la entalpía de gelatinización también aumentó con el tiempo de fermentación, reflejando una microestructura más ordenada inducida por el proceso de fermentación. La pequeña disminución mostrada después de 12 h podría estar relacionado con el deterioro a largo plazo de la cristalinidad como se detectó por las mediciones de XRD. Curiosamente, resultados similares fueron encontrados por Utrilla-Coello y col. (2014) quienes reportaron una relación parabólica entre la entalpía de gelatinización y la cristalinidad relativa de almidón de maíz hidrolizado con H_2SO_4 (3.6 M, 35 °C). Es evidente que la fragmentación de gránulos de almidón por la acción de enzimas amilolíticas generó una diversidad de fragmentos granulares y escombros. A su vez, dicha fragmentación se reflejó por un intervalo más amplio de temperatura de gelatinización.

Tabla 3.2. Evolución de las propiedades térmicas del almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con *L. bulgaricus*.

Tiempo de Fermentación (h)	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T ₀ (°C)	ΔH (J/g)
Nativo	57.65±0.32 ^a	72.16±0.26 ^c	86.13±0.92 ^d	28.48±0.25	7.65±0.31 ^e
1	57.22±0.54 ^a	71.54±0.25 ^b	86.71±0.35 ^d	29.49±1.17	7.76±0.32 ^e
3	55.36±0.23 ^b	72.62±0.12 ^{a, b}	85.25±0.54 ^c	29.89±0.57	9.69±0.68 ^d
6	55.98±0.78 ^{a, b}	73.29±0.38 ^a	88.67±0.89 ^b	32.69±1.16	11.19±0.28 ^{a, b}
12	54.14±0.47 ^b	74.54±0.42 ^a	89.09±0.25 ^b	34.95±0.76	10.13±0.47 ^{b, c}
18	55.32±0.32 ^b	74.62±0.25 ^a	90.21±0.31 ^b	34.89±0.51	10.06±0.40 ^c
24	56.54±0.43 ^a	74.72±0.61 ^a	92.13±0.51 ^a	35.59±0.86	9.93±0.72 ^d

T₀, temperatura de inicio; T_p, temperatura de pico; T_c, temperatura final; ΔH, entalpia; ΔT (T_c-T₀), rango de temperatura de gelatinización.

Las medias (± desviación estándar) en una columna seguida de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

3.2.7. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas

La viscosidad aparente de los geles de almidón (5% p/v) en función de la velocidad de corte se ilustran en la Figura 3.5. Para el AMN, el índice de comportamiento de flujo fue de aproximadamente $n = 0.72 \pm 0.02$ con $R^2 = 0.93$. El mismo valor ajustó los datos experimentales para los gránulos fermentados, pero solo para valores de velocidad de corte mayores que 1.0 s^{-1} . Para valores menores de velocidad de corte, el índice de flujo fue de $n = 0.95 \pm 0.02$ con $R^2 = 0.96$, que refleja un comportamiento de tipo Newtoniano.

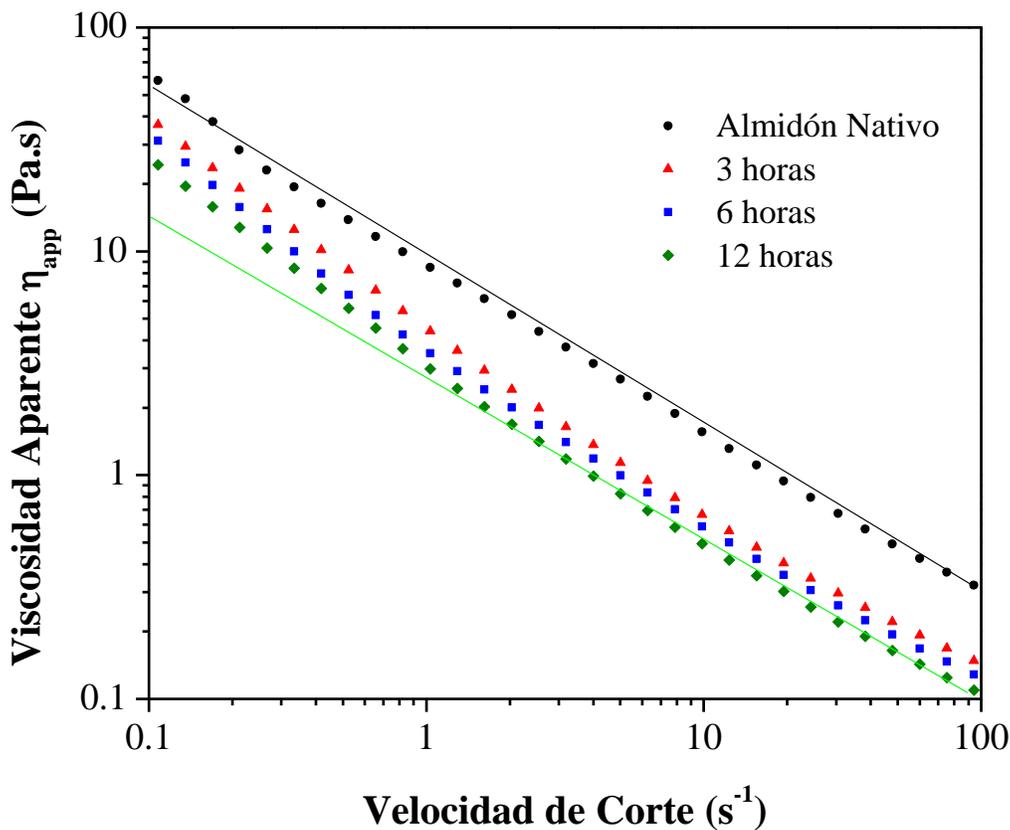


Figura 3.5. Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con *L. bulgaricus*.

La reducción de la viscosidad aparente con el tiempo de fermentación se explica en el capítulo dos de acuerdo a lo descrito por Debet y Gidley, (2007). Sin embargo, a una viscosidad de 1.0 s^{-1} (Pas) en la FAL se producen geles débiles de 2.64 Pas a menores tiempos (24 h) en comparación con la fermentación de *S. cerevisiae* que a las 168 h se obtiene una viscosidad de 6.97 Pas. La longitud de la cadena y el grado de ramificaciones de las cadenas de almidón lixiviadas tiene una fuerte influencia sobre las propiedades viscoelásticas. Específicamente, la estabilidad de la red viscosa 3D está determinada en gran medida por cadenas lineales de amilosa (Zhang y col., 2013). La reducción de la viscosidad aparente con el avance de la fermentación sugiere que la hidrólisis enzimática acoplada a la hidrólisis del ácido láctico afecta principalmente a las moléculas de amilosa, que a su vez llevan a redes de microestructuras frágiles, (es decir, geles débiles) con viscosidad reducida.

3.2.8. Potencial- ζ

El AMN mostró un potencial- ζ negativo de magnitud relativamente pequeña (aproximadamente -14.21 mV). En este estudio no fue determinado el potencial- ζ de *L. bulgaricus*. Sin embargo, los estudios de Pelletier y col., (1997) describen que diferentes cepas de *Lactobacillus* se encuentran cargados negativamente cuando los valores de pH son altos y al ser disminuido el pH los lactobacilos poseen una carga positiva. Por lo tanto, durante el proceso de fermentación el AMN presenta un potencial- ζ negativo y al disminuir el pH (Figura 3.2) por la generación de ácido láctico en el medio los lactobacilos se encuentran cargados positivamente. Este proceso hace que los lactobacilos se adhieran a los gránulos de almidón de maíz. El AMN adicionado con *L. bulgaricus* mostró una magnitud

en el potencial- ζ de aproximadamente -15.12 mV. Un aumento gradual de la magnitud del potencial- ζ ocurrió con el avance del tiempo de fermentación, alcanzando un valor de aproximadamente -26.68 mV después de 24 h (Tabla 3.1). Las enzimas amilolíticas fragmentaron las cadenas de almidón para finalmente producir glucosa. Las bacterias ácido lácticas metabolizan este sustrato produciendo alcohol, piruvato, lactato, entre otros productos intermedios (Reddy y col., 2008). El aumento observado de la magnitud del potencial- ζ (en el dominio negativo) podría explicarse a partir de la proliferación de estos productos que expresan valores potenciales negativos (por ejemplo., etanol). De esta manera, la evolución del potencial- ζ refleja el avance de hidrólisis de la cadena de almidón por la acción metabólica de los lactobacilos. Para tiempos de fermentación mayores (12-24 h), la magnitud del potencial- ζ disminuyó, un efecto que podría haber sido causado por el blindaje debido a cargas superficiales positivas llevadas por la creciente proliferación de estructuras fragmentadas y restos formados.

3.2.9. Hidrólisis Ácida

Los gránulos de AMF_x se sometieron a hidrólisis ácida (HCl 1.0 M, 38°C) durante 2 h. Los resultados del avance de la hidrólisis ácida se presentan en la última columna de la Tabla 3.1. Los gránulos de AMN se hidrolizaron hasta 36.96%. Los gránulos de AMF_x fueron menos propensos a la hidrólisis ácida a mayores tiempos de fermentación a los que fueron sometidos. Los AMF₂₄ presentaron un 9.37% de hidrólisis. La disminución de avance del hidrólisis ácida con el tiempo de fermentación está relacionada con el aumento del contenido de cristalinidad. De hecho, las estructuras cristalinas bien ordenadas son menos susceptibles de hidrólisis por digestión ácida y enzimática. Por ejemplo, ha sido reportado que el almidón

waxy de arroz fermentado e incubado con enzimas amilolíticas cambió las propiedades de digestibilidad por la disminución de la fracción de almidón de rápida digestibilidad a expensas de aumentar la fracción de almidón lentamente digerible (Zhang y col., 2016). Por otro lado, el mecanismo de digestión llamados de lado a lado (Zhang y Hamaker, 2009) propone que los gránulos de almidón de *tipo-A* contienen canales que conectan la región central a la superficie del gránulo, facilitando la penetración de enzimas y moléculas de ácido. Estos canales son consecuencia de las estructuras amorfas, que se degradan en primer lugar por reacciones de hidrólisis. De esta manera, la hidrólisis ácida reducida de almidón sería la consecuencia de fragmentos de gránulos con mayor cristalinidad y porosidad reducida. Desde el punto de vista cinético, la hidrólisis ácida está limitada por el transporte de protones dentro de la estructura del almidón.

3.3. Conclusiones

Los resultados mostraron que los gránulos de almidón de maíz alcanzaron un máximo de contenido de cristalinidad después de un tiempo de fermentación de 12 h.

Las enzimas amilolíticas y el ácido láctico producido por los lactobacilos alteraron la integridad del gránulo atacando las estructuras amorfas alrededor de la región del *hilum*.

Además, la hidrólisis amilolítica produjo sólidos fragmentados que estaban pobremente hidrolizados por condiciones ácidas rigurosas.

Se puede postular que la fermentación ácido láctica de matrices de alimentos con almidón tiene un efecto positivo en la digestibilidad ácida de gránulos de almidón, mejorando el contenido de fracciones de almidón resistente.

Capítulo Cuatro

Efectos de la Fermentación en Estado Sólido (*Aspergillus oryzae* var. *oryzae*) sobre las Propiedades Fisicoquímicas de Almidón de Maíz

Resumen

La fermentación en estado sólido es ampliamente utilizada en matrices con almidón para la producción de compuestos activos en la industria alimentaria, farmacéutica y de combustible. Una comprensión precisa de las transformaciones fisicoquímicas sufridas por el almidón durante la fermentación en estado sólido debe proporcionar información valiosa para el procesamiento adecuado de matrices de alimentos. Para evaluar las transformaciones fisicoquímicas de almidón inducido por fermentación fúngica en estado sólido, el almidón de maíz nativo se sometió a fermentación (38 °C) sobre un soporte inerte (humedad 80%) con *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* (2×10^7 células mL⁻¹). Las transformaciones fisicoquímicas en los gránulos de almidón con el tiempo de fermentación fueron monitoreadas por XRD, FTIR y DSC. El contenido de cristalinidad alcanzó un valor máximo (39.72 ± 1.02) después de 100 h. Un patrón similar fue mostrado por la relación de absorbancia 1047/1022 de mediciones de FTIR, lo que sugiere un aumento en la cristalinidad de corto alcance en los primeros 4 días de fermentación. El análisis de DSC mostró que la entalpía de gelatinización disminuyó 60.0% a lo largo del periodo de fermentación de 192 h. Los gránulos de almidón de maíz fermentado fueron menos susceptibles a hidrólisis ácida (HCl, 1.0 N, 38 °C) que los gránulos de almidón nativo. Cuanto más largo fue el tiempo de fermentación al que se sometieron los gránulos, menos susceptibles fueron a hidrólisis ácida. De esta manera, se concluye que la fermentación en estado sólido reduce la susceptibilidad a la digestión de gránulos de almidón de maíz.

Palabras clave. *Aspergillus oryzae*, Fermentación de Almidón de Maíz, Morfología y Cambios Estructurales

4.1. Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso utilizado para la producción de una amplia diversidad de alimentos, productos químicos y enzimas. La FES, es un proceso no sumergido, se lleva a cabo sobre materiales no solubles que actúan como soporte físico y fuente de nutrientes (Pandey, 1992). En ausencia de un líquido fluido, el proceso de fermentación se lleva a cabo en condiciones de bajo contenido de humedad. De esta forma, la FES solo puede llevarse a cabo por un número limitado de poblaciones de microorganismos, principalmente hongos y levaduras (Pandey y col., 2000). El uso de FES ha sido motivado por procesos basados en hongos existentes desde tiempos antiguos para la producción y conservación de matrices en alimentos, incluyendo la producción de *Penicillium roquefortii* y fermentación de arroz de *Aspergillus oryzae* para iniciar el proceso koji. La motivación se basa en el hecho de que la FES estimula los procesos de fermentación llevados a cabo por microorganismos naturales para el ensilaje y compostaje (Couto y Sanromán, 2006). Además, la FES es una técnica más segura, más simple e implica menores costos que las alternativas de fermentación sumergida (Castilho y col., 2000).

La FES se utiliza cada vez más a escala industrial para la producción de productos finos de valor agregado, como proteína unicelular, etanol, enzimas (ejemplo amilasa), aminoácidos, metabolitos secundarios activos, etc. (Krishna, 2005; Singhania y col., 2009). Además de las presuntas reducciones en los costos de operación, se ha reportado que la FES puede ofrecer mayores rendimientos o mejores características del producto en comparación con la fermentación sumergida (Acuña-Argüelles y col., 1994; Jain y col., 2013; Sandhya y col., 2005). Una característica notable de la FES es que el proceso puede llevarse a cabo sobre una

amplia diversidad de sustratos. Los residuos agroindustriales son de especial interés debido su costo relativamente bajo y su amplia disponibilidad. Los residuos agroindustriales se han propuesto como sustratos idóneos para la producción de enzimas, etanol, ácido láctico, compuestos fenólicos, etc. (John y col., 2006; Martins y col., 2011; Pandey, 2003; Viniegra-González, 2014). A pesar de sus ventajas demostradas, el proceso de operación de la FES se ve obstaculizado por las limitaciones de transferencia de masa y calor, así como el control estricto de pH, contenido de humedad y suministro de oxígeno (Couto y Sanromán, 2006; Durand, 2003). Comúnmente, la FES es llevada a cabo por hongos sobre sustratos ricos en almidón. La producción de etanol (Abouzieed y Reddy, 1986; Kotaka y col., 2008; Okamoto y col., 2011), comida tradicional (Hesseltine, 1965), producción de ácido cítrico (Betiku y Adesina, 2013) y fermentación koji (Zhu y Tramper, 2013) son ejemplos de procesos de fermentación basados en hongos empleando matrices de almidón. La acción metabólica de hongos involucra la producción de enzimas amilolíticas (por ejemplo, α -amilasa) para hidrolizar las cadenas de almidón en carbohidratos más simples. Las enzimas, metabolitos secundarios, ácido láctico, cítrico y etanol se convierten en subproductos de la actividad metabólica de los hongos. A través de las enzimas amilolíticas producidas, la actividad fermentativa afecta las propiedades fisicoquímicas de los gránulos de almidón. A diferencia de las fermentaciones sumergidas, el contenido de humedad y el transporte de oxígeno imponen importantes limitaciones al transporte de las enzimas amilolíticas a la estructura del sustrato (Gutiérrez-Rojas y col., 1995; Mitchell y col., 2004). Actualmente, los mecanismos involucrados en las transformaciones de gránulos de almidón en fermentaciones en estado sólido empleando hongos no se han aclarado completamente. En particular, no se han explorado los cambios en la cristalinidad de almidón y las propiedades térmicas. Los

resultados en esta línea deben proporcionar importantes ideas para el diseño de procesos de la FES empleando hongos con una utilización óptima de sustratos (Albaek y col., 2011). Además, la FES puede ser vista como un proceso para la producción de almidón modificado con propiedades deseadas, tales como digestibilidad lenta y cristalinidad reducida (Fuentes-Zaragoza y col., 2010).

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la fermentación en estado sólido (*Aspergillus oryzae var. oryzae*) sobre las propiedades fisicoquímicas de Almidón de Maíz.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Morfología

La morfología proporciona algunos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la degradación amilolítica de los gránulos de almidón por la acción de los hongos. En la Figura 4.1a se presenta una imagen de microscopía óptica de los gránulos de almidón nativo, que presentan la cruz de Malta típica en el centro del gránulo. Los gránulos de almidón se inocularon con *A. oryzae* para llevar a cabo la fermentación en estado sólido durante 192 h. Después de 48 h, las esporas de los hongos se propagaron alrededor de los gránulos de almidón (Figura 4.1b), algunos de ellos unidos a la superficie de los gránulos de almidón. El crecimiento de los hongos parece estar concentrado en la región sobre el *hilum* al centro del gránulo. La unión de los hongos a los gránulos de almidón involucra la unión de los enlaces de hidrógeno (Imam y Harry-O'Kuru, 1991). El proceso de unión está relacionado con la producción de hidrofobinas, que son proteínas que contribuyen al desarrollo aéreo de hongos y a las relaciones interfaciales entre la pared celular de hongos y superficies sólidas. A su vez, estas proteínas imparten propiedades hidrofóbicas al micelio implicadas en la unión de las hifas en superficies hidrofóbicas (Volke-Sepúlveda y col., 2006; Wösten, 2001), por ejemplo, la matriz compleja formada por el soporte inerte y gránulos de almidón. Debe destacarse que la superficie del gránulo de almidón es hidrofóbica por naturaleza dado su alto contenido de amilopectina. Después de 96 h (Fig. 4.1c), el gránulo de almidón apareció completamente colonizado por los hongos.

Debido a que las enzimas amilolíticas son secretadas extracelularmente, es más fácil el ataque hacia los gránulos de almidón (Jin y col., 1998). Sugai-Guérios y col. (2016) han sugerido

diferentes modos de crecimiento y funciones para la penetración de hifas largas y cortas. Las hifas largas exploran la composición de la partícula y buscan nuevos sitios de colonización a través de la partícula, mientras que las hifas cortas actúan como anclas para la colonia y como productores de enzimas. Estos tipos de hifas parecen estar presentes en la colonización de los gránulos de almidón (Fig. 4.1c).

Se puede observar en la Figura 4.1d algunas grietas en los gránulos de almidón a las 144 h de incubación, que fueron causadas por la acción combinada de hinchamiento de gránulos y enzimas amilolíticas. Las enzimas amilolíticas (por ejemplo, α -amilasa) producidas por los hongos erosionan la región externa del gránulo de almidón alrededor de la cruz de Malta para penetrar la estructura interna a través de la *hilum*. De esta manera, la descomposición del gránulo de almidón se convirtió en una consecuencia de la degradación de los anillos de las cadenas amorfas más internas. En la Figura 4.1e se ilustra la morfología de los gránulos de almidón al final de los procesos de fermentación después de 196 h. Para una mejor visualización de la morfología de los gránulos, éstos fueron lavados varias veces para eliminar las colonias de hongos. La acción metabólica de *A. oryzae* llevó a la fragmentación del gránulo, los fragmentos aparecen como gajos separados de la estructura original por medio de grietas en la región del *hilum*.

Las imágenes de SEM se utilizaron para obtener una descripción más detallada de los cambios morfológicos. En la Figura 4.1f se ilustra la morfología (5000x) del gránulo de almidón nativo, mostrando una superficie que no ha sido afectada por la degradación enzimática. La superficie del gránulo ya no está lisa después de 48 h de fermentación (Fig. 4.1g), observándose algunos desgastes en la superficie. El efecto se profundiza durante

tiempos más largos ya que las fracturas y regiones erosionadas están presentes después de 96 (Fig. 4.1 h) y 144 h (Fig. 4.1i). La forma poligonal de los gránulos de almidón nativos cambió promoviendo una desorganización al final del proceso de fermentación (Fig. 4.1j), generando una erosión severa y fracturas. Se observa un aspecto exfoliado de la superficie del gránulo, probablemente inducido por la acción combinada del hinchamiento de gránulos y las enzimas amilolíticas producidas por hongos.

Las imágenes de microscopía óptica y SEM proporcionan una idea sobre los mecanismos involucrados en la fragmentación de los gránulos de almidón. Los gránulos de almidón nativos están formados por regiones semi-cristalinas orientadas radialmente y anillos de crecimiento amorfos organizados alrededor del *hilum* (Gallant y col., 1997). El gránulo de almidón es una estructura compacta, aunque el *hilum* es la región más frágil con cadenas de almidón mal organizadas (Buléon y col., 1998). Las imágenes de la Figura 4.1 indican que la fragmentación del gránulo comenzó alrededor de las fracturas del *hilum*. Después de un periodo de adaptación de aproximadamente 24 h, la población de hongos creció alrededor de la región del *hilum* y fue capaz de producir enzimas amilolíticas para atacar a la región vulnerable localizada alrededor de la cruz de Malta. A pesar de que la superficie del gránulo también fue erosionada, las regiones de crecimiento amorfo dentro de la estructura del gránulo son más susceptibles a la degradación por las enzimas amilolíticas. Las fracturas realizadas a través del *hilum* aumentan la difusión de las enzimas amilolíticas (Chen y col., 2006). Después de un tiempo relativamente prolongado de aproximadamente 148 h, los gránulos de almidón se agrietaron dejando una estructura en gran parte rota.

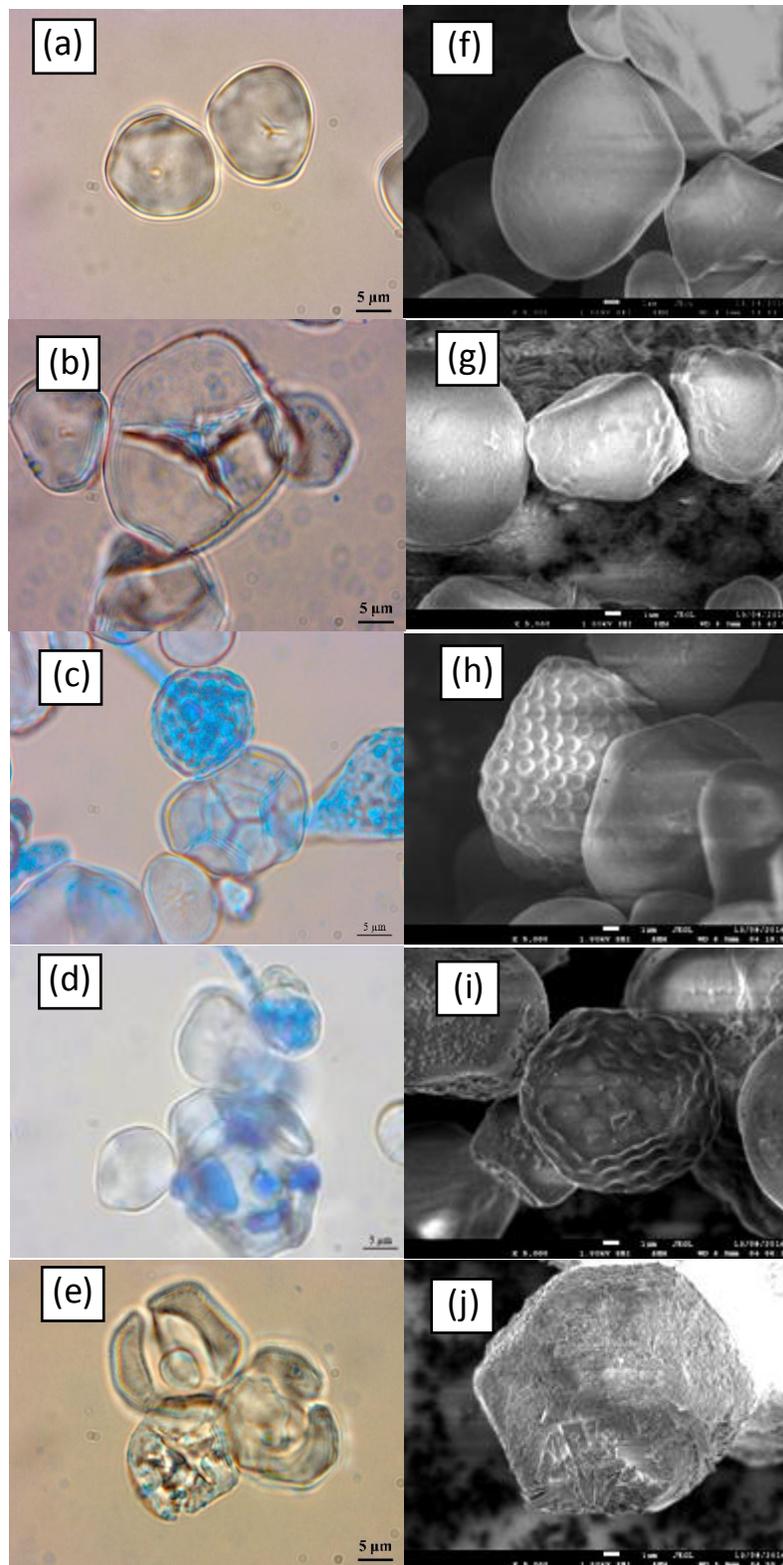


Figura 4.1. (a)-(e) microscopía óptica y (f)-(j) imágenes SEM de gránulos de almidón de maíz nativo (0 h) y fermentado (48, 96, 144, 196 h) con *A. oryzae*.

4.2.2. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)

La acción fermentativa de los hongos condujo a cambios importantes en el tamaño de los gránulos de almidón a medida que las enzimas amilolíticas erosionaron la superficie del gránulo. Como consecuencia, el tamaño medio de los gránulos de almidón sufrió reducciones graduales. El diámetro medio de longitud $d_{1,0}$ de los gránulos fermentados fue monitoreado mediante mediciones directas en las imágenes de microscopía óptica. La Figura 4.2 presenta la disminución de $d_{1,0}$ con el tiempo de fermentación.

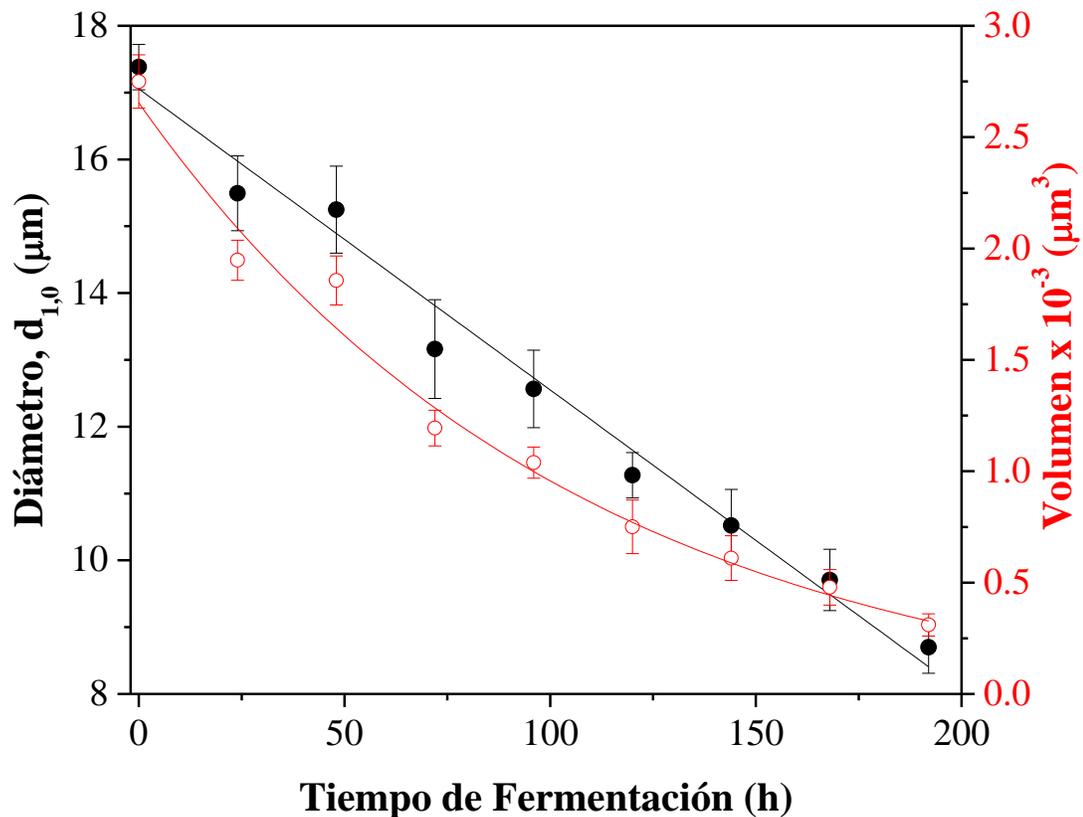


Figura 4.2. Evolución del diámetro de los gránulos con el tiempo de fermentación.

Es un comportamiento lineal aparente, aunque el volumen medio exhibió un decaimiento exponencial con una constante de tiempo de aproximadamente 117 ± 4.5 h. Esto sugiere que la degradación de los gránulos de almidón por *A. oryzae* sigue la cinética de primer orden, con una constante de tiempo de orden de algunos pocos días. Favela-Torres y col. (1998) mostraron constantes de tiempo de aproximadamente 30 h para el consumo de glucosa por *A. niger* mediante fermentación en estado sólido. Resultados similares fueron obtenidos por Aguilar y col. (2001) para la producción de tanasa a partir de glucosa.

La glucosa es un carbohidrato simple que está directamente disponible para el proceso metabólico de los hongos. A diferencia de las cadenas de almidón que son moléculas bastante grandes que requieren fragmentación antes de ser metabolizadas por las colonias de *Aspergillus*. La diferencia entre la constante de tiempo para el uso de glucosa y la degradación de gránulos de almidón se debe principalmente a la etapa de hidrólisis preliminar llevada a cabo por enzimas amilolíticas.

4.2.3. Análisis de Difracción de Rayos-X

En la Figura 4.3a se ilustran los patrones de XRD de almidón nativo y gránulos fermentados. Los gránulos de almidón nativo presentaron un patrón de XRD de *tipo A*, con fuertes picos de intensidad en 15.12, 17.17, 18.05 y 23.0 a 2θ -grados (Buléon y col., 1998). Estos picos de intensidad se mantuvieron a lo largo del proceso de fermentación. Sin embargo, el pico de intensidad a 20 grados se amplió después de un tiempo de fermentación de 96 h.

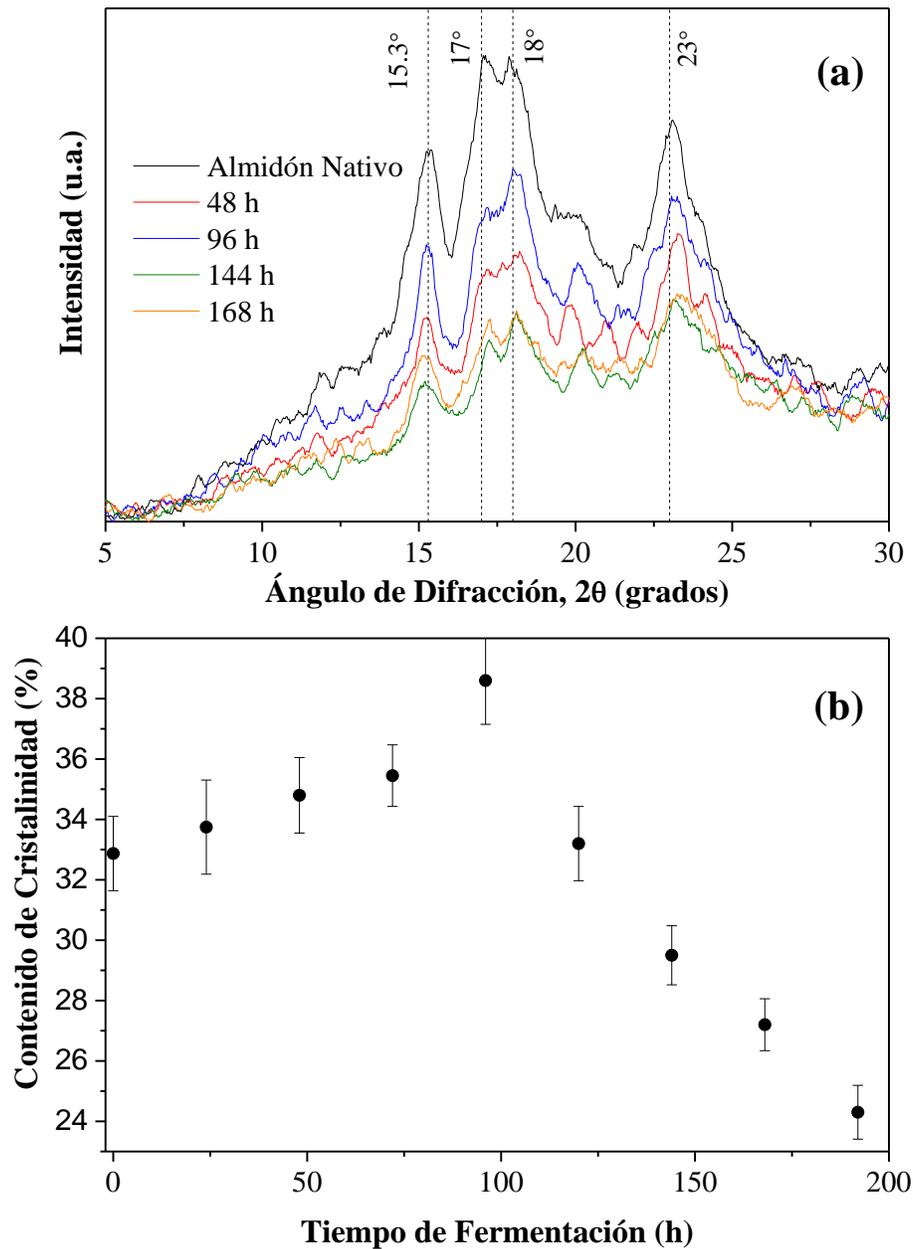


Figura 4.3. Patrones de difracción de rayos-X para almidón de maíz nativo y fermentado con *A. oryzae*. Las líneas verticales denotan picos distintivos de cristalinidad tipo-A.

Se obtuvieron resultados similares para la hidrólisis ácida (Wang y col., 2003), glucoamilasa, (Aggarwal y Dollimore, 1998) y α -amilasa (Lacerda y col., 2008) para tratamientos de almidón de maíz. El contenido de la cristalinidad en función del tiempo de fermentación se presenta en la Figura 4.3b, mostrando un aumento en las primeras 96 h. Mayores fracciones de amilopectina conducen a una mayor cristalinidad (Zhang y col., 2006). Probablemente las enzimas amilolíticas producidas por *A. oryzae* atacan preponderantemente las regiones amorfas de los gránulos de almidón. Sin embargo, durante tiempos más largos el contenido de cristalinidad mostró una fuerte disminución. Este efecto podría atribuirse a la reducción de las regiones amorfas en los primeros días, que conduce a un agrietamiento y posteriormente a una fragmentación de los gránulos de almidón. Como consecuencia, las regiones cristalinas están más expuestas al ataque de las enzimas desramificadoras producidas por las colonias de hongos. Zhang y col. (2006) reportaron resultados similares para el almidón tratado con α -amilasa y amilogucosidasa, donde la cristalinidad mostró un ligero aumento durante el periodo inicial de hidrólisis. Asimismo, Li y col. (2013) encontraron que las enzimas amilolíticas obtenidas a partir de levadura de arroz aumentaron la cristalinidad del almidón de arroz en la primera etapa de la fermentación.

4.2.4. Análisis de los Gránulos de Almidón por FTIR

Los cambios en las bandas de absorbancia vinculados con las estructuras cristalinas y amorfas del almidón, fueron investigadas.

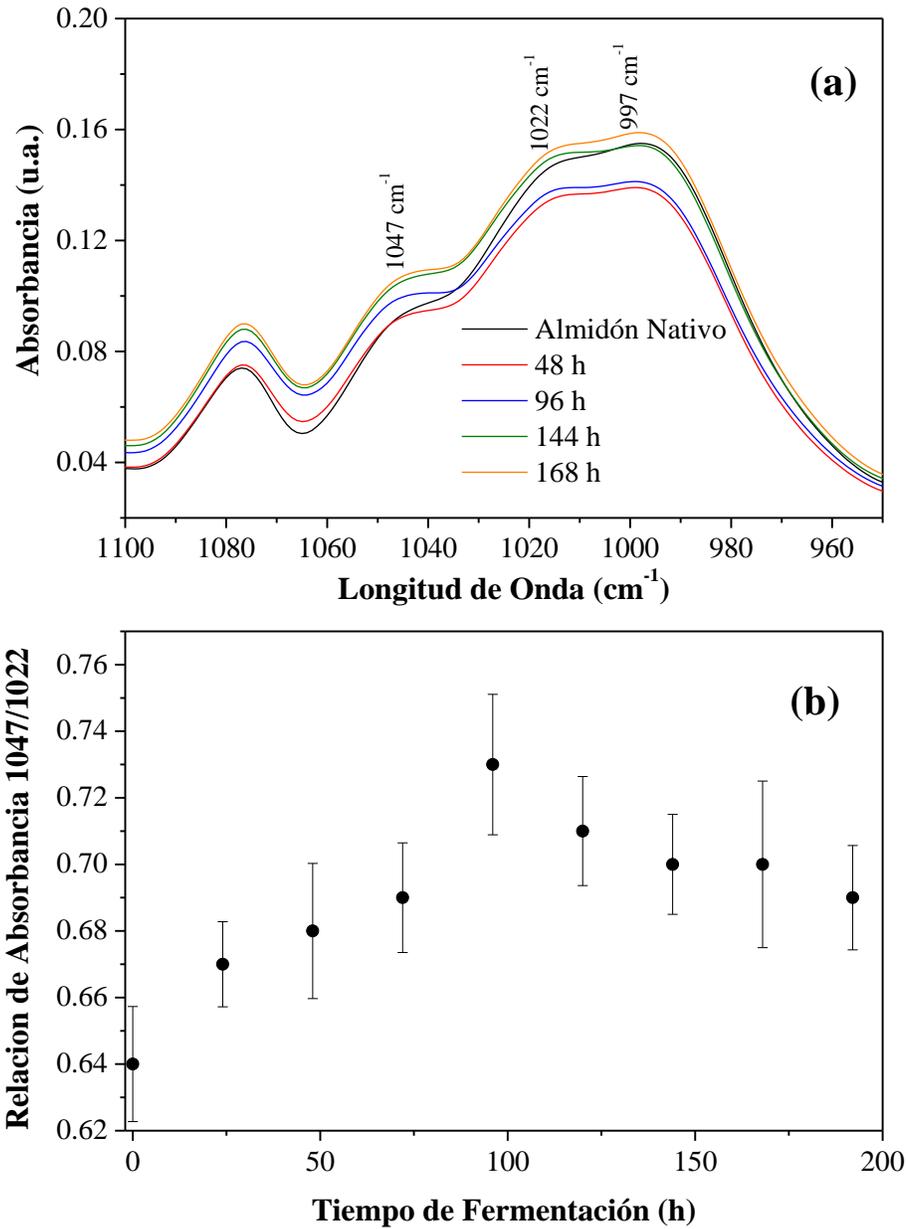


Figura 4.4. (a) Espectro de FTIR para gránulos de almidón nativo y fermentado. (b) Relación de la absorbancia $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$ en función del tiempo de fermentación.

Dado que las bandas de 1047 y 1022 cm^{-1} están ligadas a estructuras cristalinas y amorfas, la relación de absorbancia 1047 cm^{-1} / 1022 cm^{-1} se relaciona comúnmente como un índice del ordenamiento de los dominios cristalinos a dominios amorfos en almidón. En la Figura 4.4a se presenta el patrón de absorbancia para gránulos de almidón nativos y fermentados. La relación de absorbancia aumentó en las primeras horas para alcanzar un valor máximo a las 96 h aproximadamente. Mientras que los patrones de XRD reflejaron el ordenamiento de largo alcance del empaque cristalino, la relación de absorbancia 1047 cm^{-1} / 1022 cm^{-1} reflejó el orden de corto alcance mediante estructuras de doble hélice. Los resultados en las Figuras 4.3b y 4.4b indican que las enzimas fúngicas hidrolizan tanto las regiones amorfas de los gránulos de almidón como las estructuras de doble hélice. En el punto medio del periodo de fermentación, el contenido de cristalinidad alcanza un valor máximo a medida que se reduce la cantidad de regiones amorfas. La ruptura gradual de la estructura del gránulo a prolongados tiempos de fermentación expuso las regiones cristalinas a la acción de las enzimas amilolíticas, provocando una reducción gradual del porcentaje de cristalinidad.

4.2.5. Propiedades Térmicas del Almidón Nativo y Fermentado

Las propiedades térmicas de los gránulos de almidón fermentados proporcionan otra visión del proceso de degradación. Los resultados del análisis de DSC de los residuos de almidón de la fermentación se presentan en la Tabla 4.1. Debe recordarse que, en lugar de la cristalinidad, las mediciones de DSC proporcionan información sobre el grado de ordenamiento de las estructuras moleculares dentro del gránulo de almidón.

Tabla 4.1. Evolución de las propiedades térmicas del almidón de maíz fermentado a diferentes tiempos con *A. oryzae*.

Tiempo de Fermentación (h)	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔH (J/g)
Native	59.65±0.32 ^d	72.16±0.26 ^{cd}	86.13±0.92 ^c	7.65±0.31 ^a
24	60.22±0.54 ^c	71.54±0.25 ^d	86.71±0.35 ^c	7.76±0.32 ^a
48	60.76±0.23 ^c	72.62±0.12 ^c	85.25±0.54 ^c	6.69±0.68 ^b
72	61.98±0.78 ^b	72.19±0.38 ^c	88.67±0.89 ^c	6.89±0.28 ^b
96	62.64±0.75 ^b	74.64±0.38 ^b	88.65±0.84 ^b	6.45±0.45 ^b
120	63.15±0.47 ^b	74.16±0.42 ^b	89.09±0.25 ^a	6.13±0.47 ^c
144	63.74±0.43 ^a	75.72±0.61 ^b	90.13±0.51 ^a	5.93±0.72 ^c
168	64.12±0.85 ^a	77.74±0.74 ^a	89.75±0.63 ^a	5.65±0.67 ^c
192	64.98±0.79 ^a	78.45±0.73 ^a	89.12±0.74 ^a	4.97±0.85 ^c

T_o, temperatura de inicio; T_p, temperatura de pico; T_c, temperatura final; ΔH, entalpia; ΔT (T_c-T_o), rango de temperatura de gelatinización.

Las medias (± desviación estándar) en una columna seguida de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La temperatura de inicio aumentó con el tiempo de fermentación, lo que indica que la complejidad de la estructura molecular de los residuos de almidón tiene una estructura molecular más compleja. Es decir, las enzimas amilolíticas producidas por *A. oryzae* atacan en primer lugar los enlaces de la estructura más simple. Este efecto fue evidenciado por el desplazamiento a la derecha de la temperatura de pico, lo que sugiere que las estructuras más ordenadas se mantienen después de la degradación enzimática. Por otra parte, la temperatura final no mostró un aumento significativo con el tiempo de fermentación. De esta manera, el intervalo de temperatura de fusión disminuyó con el tiempo, indicando que los residuos de almidón tienen una estructura más homogénea. Dado a su estructura molecular simple, las cadenas lineales de amilosa y amilopectina de cadena corta son más susceptibles al ataque enzimático que las moléculas de amilopectina ramificadas. A su vez, este efecto conduce a distribuciones menos heterogéneas del ordenamiento molecular. La entalpía de gelatinización muestra una disminución consistente con el tiempo de fermentación, indicando que los residuos de almidón alcanzaron un orden relativamente bajo en comparación con el nativo. Resultados similares fueron reportados por Shrestha y col. (2012) para la digestión de granulos de almidón de maíz con una mezcla de enzimas amilolíticas (α -amilasa, amiloglucosidasa e isoamilasa).

4.2.6. Viscosidad Aparente de las Dispersiones Gelatinizadas

En la Figura 4.5 se presenta el comportamiento de la viscosidad aparente de los geles de almidón (5% p/v) en función de la velocidad de corte.

El almidón nativo mostró un índice de comportamiento de flujo de aproximadamente $n = 0.72 \pm 0.02$ ($R^2 = 0.93$). El mismo valor ajustó los datos experimentales para los gránulos fermentados, pero sólo para valores de velocidad de corte inferiores a 7.0 s^{-1} . Para mayores valores de velocidad de corte, el índice de flujo fue $n = 0.65 \pm 0.02$ ($R^2 = 0.96$). La reducción de la viscosidad aparente con el tiempo de fermentación puede explicarse de la siguiente manera.

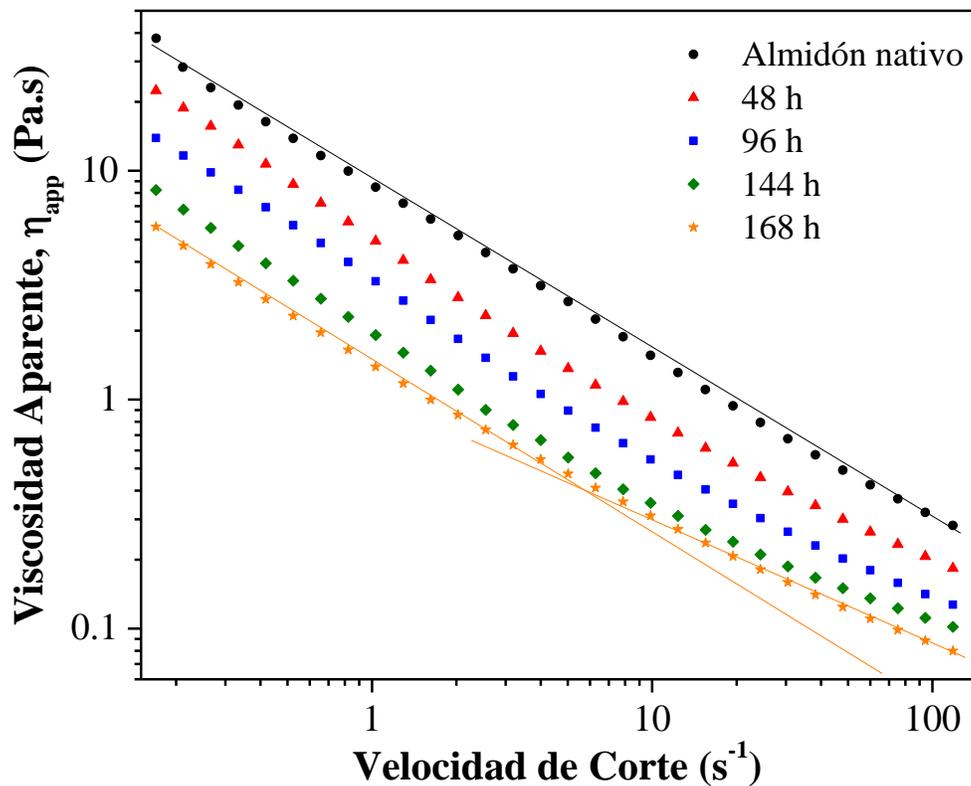


Figura 4.5. Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de almidón de maíz nativo y fermentado con *A. oryzae*.

Anteriormente se ha enfatizado que las propiedades reológicas de un material reflejan su estructura. Durante la gelatinización, los gránulos de almidón se hinchan hasta varias veces su volumen inicial. La hinchazón se acompaña de lixiviación de los constituyentes de gránulos, predominantemente de amilosa, y la formación de una red tridimensional (Tester y col., 1990).

La viscosidad máxima a una concentración dada refleja la capacidad de los gránulos para hincharse libremente antes de su descomposición física. Los almidones que son capaces de hincharse hasta un alto grado también son menos resistentes a la descomposición en la cocción y por lo tanto exhiben una viscosidad significativa que disminuye después de alcanzar la viscosidad máxima (Adebowale y Lawal, 2003). Este efecto se ve reflejado a mayor tiempo de fermentación se produce una viscosidad aparente baja con forme aumenta la velocidad de corte (Figura 4.5).

Mediante la aplicación de una modificación química se genera un cambio considerable en las propiedades reológicas, la viscosidad de los geles de almidón se puede aumentar o reducir. Adebowale y Lawal (2003) informaron que una modificación química como es la acetilación en almidones de frijol *Mucuna* conduce a una disminución y caída de la viscosidad.

4.2.7. Potencial- ζ

Las mediciones del potencial- ζ (Fig. 4.6) se llevaron a cabo para monitorear las transformaciones de los gránulos de almidón. El almidón de maíz nativo presentó un potencial- ζ negativo de magnitud relativamente pequeña (aproximadamente de -14.21 mV). Ocurrió un aumento gradual de la magnitud del potencial- ζ con el avance del tiempo de fermentación,

alcanzando un valor de aproximadamente -31.50 mV después de 192 h. Las enzimas amilolíticas fragmentaron las cadenas de almidón para finalmente producir glucosa.

A. oryzae metaboliza el almidón como sustrato produciendo α -amilasa (Abe y col., 2006; Carlsen y col., 1996) o productos intermedios como etanol (Neri y col., 2009; Nigam y Singh, 1995). La disminución del potencial- ζ en el dominio negativos puede deberse a la complejidad de un gran número de compuestos derivados de la acción metabólica de *A. oryzae* de acuerdo con lo establecido por Lee y col., 2010.

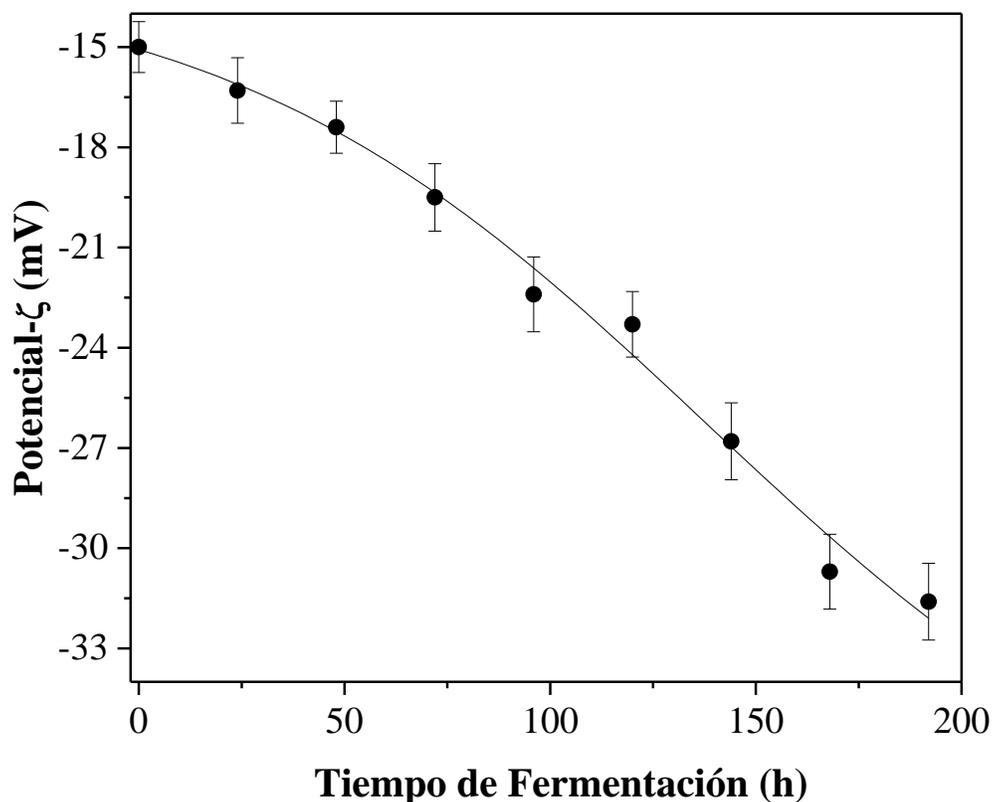


Figura 4.6. Potencial- ζ en función del tiempo de fermentación.

4.2.8. Hidrólisis Ácida

Los gránulos de almidón se sometieron a hidrólisis ácida (HCl 1.0 M, 38 °C) durante 2 h y los resultados se presentan en la Figura 4.7. Los gránulos de almidón nativo se hidrolizaron hasta un 37.12%. Sin embargo, los gránulos de almidón fermentados fueron menos propensos a hidrólisis ácida, cuando más largo era el tiempo de fermentación al que estaban sometidos. El avance de hidrólisis fue reducido aproximadamente 10.5% al final del periodo de fermentación.

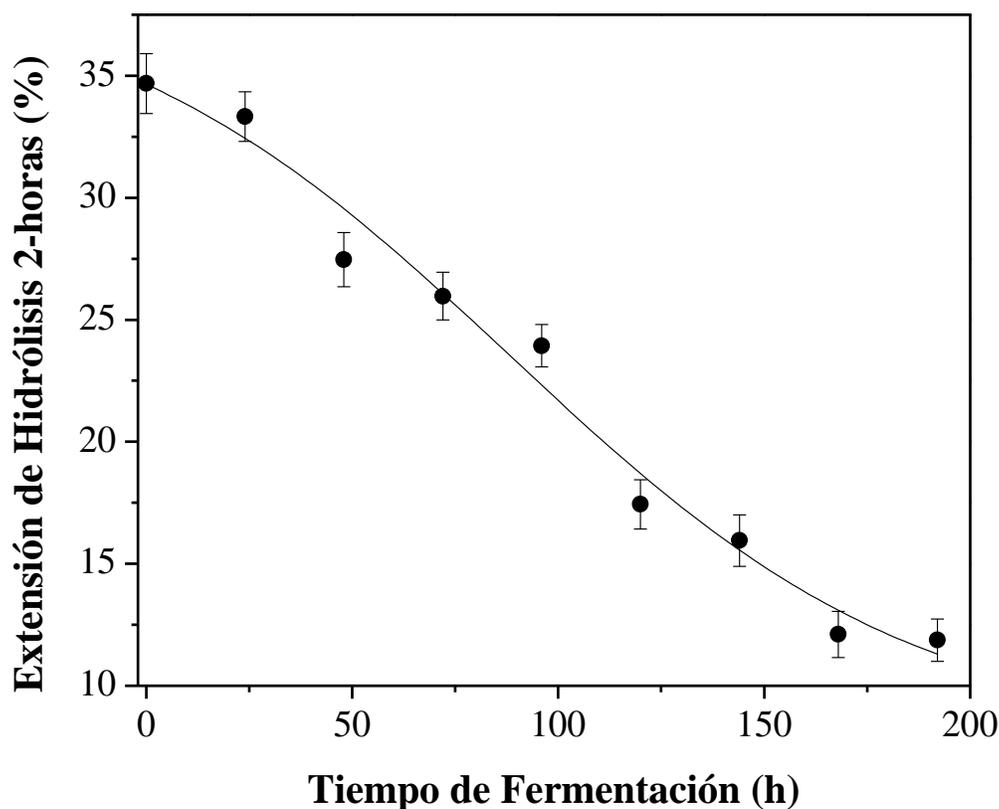


Figura 4.7. Hidrólisis ácida (2 horas) de almidón nativo y residual en función del tiempo de fermentación.

La disminución del avance de la hidrólisis ácida con el tiempo de fermentación parece estar relacionada con el aumento del contenido de cristalinidad. En la Figura 4.3 se pudo observar que a las 96 h aumenta considerablemente el contenido de cristalinidad sin embargo, Copeland y col., (2009) describen que las láminas cristalinas son atacadas en menor grado por las enzimas amilolíticas que las regiones amorfas. Además, dichos autores mencionan que el almidón resistente no es completamente digerible este efecto se presenta en la presente investigación (Figura 4.7). Después de dos horas de hidrolisis con ácido clorhídrico se aprecia que el contenido de almidón disminuye por lo tanto se puede decir que está relacionado con almidón resistente.

Por ejemplo, se ha reportado que el almidón de arroz incubado con enzimas amilolíticas cambió las propiedades de digestibilidad al disminuir la fracción de almidón rápidamente digerible a expensas del aumento de la fracción de almidón lentamente digerible (Zhang y col., 2016).

El nombre de almidón resistente es empleado para describir al almidón en los alimentos que no es completamente digerible.

4.3. Conclusiones

Las enzimas amilolíticas producidas por los hongos alteran la estructura del almidón, dando lugar a gránulos fragmentados, disminución de la cristalinidad y entalpía de gelatinización, así como a reducciones de la susceptibilidad a la hidrólisis ácida.

Se postuló que el proceso de fermentación en estado sólido produjo residuos granulares con estructura compacta y canales reducidos, que a su vez se convierten en una obstrucción para el transporte de enzimas.

La fijación de hongos a la superficie del gránulo es un paso importante para conseguir una fermentación prolongada de los gránulos de almidón.

Capítulo Cinco

Discusiones Generales

5. Discusiones Generales

5.1. Morfología

Los resultados de morfología presentados en esta investigación nos indican que si hay una modificación de la estructura de los gránulos de AMF para los tres casos estudiados. Las tres cepas en estudio poseen la capacidad de invadir los gránulos de AMN generando menor tamaño, gránulos rotos, porosos y cristalinos a diferentes tiempos de fermentación.

En las primeras horas de la fermentación ocurre una rápida caída del oxígeno y es cuando comienza el ataque enzimático generando una fuente de carbono para el metabolismo de los agentes de fermentación. Diversas enzimas son empleadas en la hidrólisis del almidón, una de las más importantes es la α -amilasa (E.C.3.2.1.1) que actúa catalizando la hidrólisis de los enlaces internos α -1,4 glucosídico del almidón liberando glucosa y maltosa. Esta enzima es secretada por diversos microorganismos entre los cuales destacan los empleados en la presente investigación, además de otras levaduras, bacterias Gram positivas y hongos del género *Aspergillus* (Sivaramakrishnan y col., 2006; Nigam y Singh, 1995).

El gran éxito de *Saccharomyces cerevisiae* es su capacidad de producir etanol y CO₂ por lo que es principalmente empleada en la industria alimentaria. Sin embargo Teste y col. (2010) y Yamamoto y col. (2004) indican que *Saccharomyces cerevisiae* posee la habilidad de generar una amplia gama de hidrolasas degradadoras de almidón como la α -glucosidasa (nombres alternativos: γ -amilasa; glucano 1,4- α -glucosidasa; aminoglucosidasa; exo-1,4- α -glucosidasa; glucoamilasa; α -glucosidasa lisosómica; 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa) la cual es capaz de

romper el último enlace $\alpha(1-4)$ glicosídico en el extremo no reductor de la cadena de amilosa y amilopectina, liberando glucosa, además puede romper los enlaces glicosídicos $\alpha(1-6)$.

Por otra parte, diversos tipos de bacterias gram positivas son ampliamente utilizadas en la producción de α -amilasa como por ejemplo *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Sivaramakrishnan y col., 2006). Aguilar y col. (2000) menciona que *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T es una nueva bacteria capaz de producir ácido láctico y α -amilasa a partir de almidón. La enzima obtenida por estos investigadores tenía una buena estabilidad en presencia de almidón, en rango de pH entre 5-6 y temperatura óptima de 55 °C.

Actualmente el uso de hongos se ha intensificado debido a su alta capacidad para producir amilasas. Sivaramakrishnan y col., (2007) reportaron la producción de α -amilasa por fermentación en estado sólido con *A. oryzae* obteniendo hasta 15095 U/g de sustrato seco a las 72 h de fermentación empleando como sustrato salvado de trigo. Por su parte, Francis y col. (2003) describen que *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 produce 6583 U/g de α -amilasa empleando como fuente de carbono residuos de granos de la elaboración de cerveza en combinación con harina de soya. Kammoun y col. (2008) describen que *A. oryzae* CBS 819.72 es un excelente productor de α -amilasa obteniendo valores de 151. U/mL cuando es empleado como medio de cultivo el sub-producto de la molienda de trigo.

Por su parte, *L. bulgaricus* es una cepa invasiva que se adhiere a los gránulos y modifica la estructura del almidón de tal manera que fragmenta los gránulos en un menor tiempo en comparación con las otras dos cepas evaluadas. Sin embargo, *S. cerevisiae* entra en los gránulos cuando comienzan a hincharse y modifica la estructura deformándola lentamente.

En la fermentación sólida debido al crecimiento lento de *A. oryzae* las modificaciones en la cristalinidad, ruptura y tamaño del gránulo ocurren en un mayor tiempo (8 días). El efecto más importante mostrado por *A. oryzae* es la generación de gránulos porosos para su aplicación en alimentos.

En las últimas décadas, se ha optado por emplear una tecnología menos agresiva con el ambiente sustituyendo la hidrólisis ácida del almidón por el uso de enzimas para la conversión del almidón en la producción de maltodextrina, almidones modificados o jarabes de glucosa y fructosa (Van Der Maarel, 2002).

Un producto obtenido por hidrólisis ácido-enzimática de almidón de maíz es el jarabe de alta maltosa cervecero o también llamado glucosa enzimática, está compuesto por dextrosa, maltosa y polisacáridos, en proporciones variables según el grado de conversión. Es utilizado en la industria cervecera como sustituto de la malta de cereales y se emplea en la fabricación de golosinas, en panificación y otros productos alimenticios (Nigam y Singh, 1995). Algunas otras aplicaciones de la hidrólisis de almidón se basan principalmente en la producción de azúcares (Crabb y Mitchinson, 1997) y etanol (Bothast y Schlicher, 2005).

5.2. Diámetro Promedio ($d_{1,0}$)

En la Tabla 5.1 se presenta la comparación del diámetro en función del tiempo de fermentación para las tres fermentaciones en estudio. *L. bulgaricus* destacó por poseer la capacidad de ruptura de los gránulos de AMF obteniendo diámetros de 6.07 μm en un menor tiempo de fermentación (24 h).

Un factor importante durante las fermentaciones realizadas es la generación de poros en los gránulos de almidón provocados principalmente por las enzimas extracelulares secretadas por los microorganismos. Por su parte, Chen y Zhang (2012) realizaron una hidrólisis de gránulos de AMN empleando una glucoamilasa para controlar el tamaño de poro, los resultados que obtuvieron fueron que el área superficial específica para AMN fue de 0.76 m^2/g y a las 4 h de hidrólisis incremento a 1.74 m^2/g .

Tabla 5.1. Diámetro promedio ($d_{1,0}$) de los gránulos de almidón.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida	Fermentación Ácido Láctica	Fermentación Sólida
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>A. oryzae var. oryzae</i>
	$d_{1,0}$ (μm)		
0	17.31 \pm 0.73 ^a	17.31 \pm 0.67 ^a	17.38 \pm 0.34 ^a
1		16.28 \pm 0.76 ^{a,b}	
3		13.35 \pm 0.78 ^b	
6		10.74 \pm 0.96 ^c	
12	17.27 \pm 0.72 ^a	7.08 \pm 1.90 ^d	
18		6.57 \pm 1.72 ^d	
24	17.12 \pm 0.81 ^a	6.07 \pm 1.13 ^d	15.49 \pm 0.56 ^b
48	16.68 \pm 1.32 ^a		15.24 \pm 0.65 ^b
72	16.06 \pm 1.65 ^{a,b}		13.16 \pm 0.74 ^c
96	15.28 \pm 1.72 ^b		12.56 \pm 0.58 ^c
120	14.51 \pm 1.86 ^b		11.27 \pm 0.34 ^d
144			10.52 \pm 0.54 ^d
168	13.09 \pm 1.56 ^{b,c}		9.70 \pm 0.46 ^d
192			8.69 \pm 0.39 ^{d,e}

Por otra parte, determinaron el volumen de mesoporos para el AMN fue de $1.4 \text{ cm}^3/\text{g}$ y a las 4 h de hidrólisis aumento hasta $5.62 \text{ cm}^3/\text{g}$, además del diámetro medio de los mesoporos para el AMN fue de 200 nm y 960 nm para el hidrolizado a 4 h. Estos investigadores determinaron la capacidad de absorción de agua encontrando que el AM hidrolizado aumentaba a 1.83 g/g muestra, mientras que el AMN presentaba una capacidad de absorción de agua de 1.04 g/g muestra. Una aplicación de los almidones porosos es su uso en la adsorción o encapsulación de fármacos y saborizantes, debido a su alta capacidad de absorción.

5.3. Cristalinidad de Largo Alcance Durante las Fermentaciones Evaluadas

La cristalinidad de largo alcance para las tres fermentaciones evaluadas se presenta en la Tabla 5.2. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre los mayores valores de cristalinidad. Mediante la fermentación con *S. cerevisiae* se obtuvo el valor más alto de cristalinidad de 40.94 % a las 96 h. Por otra parte, con *L. bulgaricus* debido a su capacidad de crecimiento rápido es capaz de modificar la cristalinidad de los gránulos de AMF en 3 h y aumentarla 6.56 % con respecto al AMN. Esta bacteria es considerada más eficiente para la modificación de la cristalinidad del almidón de maíz. *A. oryzae* aumenta la cristalinidad un 5.73 % en un tiempo de 96 h sin embargo, la ventaja adicional es que puede modificar la cristalinidad disminuyendo un 8.57 % con respecto al AMN en 8 días. Este factor es benéfico para una doble utilización.

Tabla 5.2. Cristalinidad de largo alcance durante las fermentaciones evaluadas.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentación Ácido Láctica <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	Fermentación Sólida <i>A. oryzae var. oryzae</i>
	Cristalinidad (%)		
0	32.82 ± 1.50 ^d	32.88 ± 2.12 ^c	32.87 ± 1.23 ^b
1		33.73 ± 1.24 ^c	
3		39.44 ± 1.13 ^a	
6		35.72 ± 1.02 ^b	
12	33.20 ± 1.26 ^d	32.84 ± 0.95 ^c	
18		31.26 ± 0.87 ^d	
24	37.99 ± 1.65 ^c	32.02 ± 0.96 ^{c,d}	33.74 ± 1.56 ^b
48	38.13 ± 1.77 ^{b,c}		34.80 ± 1.25 ^b
72	39.28 ± 1.56 ^a		35.40 ± 1.02 ^b
96	40.94 ± 1.58 ^a		38.60 ± 1.45 ^a
120	39.14 ± 1.49 ^{a,b}		33.20 ± 1.23 ^b
144			29.50 ± 0.98 ^c
168	38.40 ± 1.56 ^{b,c}		27.20 ± 0.86 ^d
192			24.30 ± 0.89 ^e

Ao y col. (2007) obtuvieron una cristalinidad de 30.1 % para el almidón de maíz nativo y en la presente investigación se obtuvieron valores similares de entre 32 % para el AMN. Estos autores evaluaron diferentes tratamientos enzimáticos para la modificación del almidón de maíz llegando a la conclusión que la estructura cristalina en los almidones modificados contribuye a la digestión lenta del almidón modificado y su posible aplicación en alimentos.

5.4. Cambios en la Absorbancia de la Cristalinidad de Corto Alcance (Relación $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$)

Los resultados de la cristalinidad de corto alcance de la relación de absorbancia $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$ se presentan en la Tabla 5.3. Los mejores resultados fueron obtenidos con *L. bulgaricus* debido a que posee la capacidad de actuar sobre las estructuras de doble hélice aumentando el grado de cristalinidad de corto alcance presentando el máximo valor de 0.78 a las 24 h. Li y col., (2013) evaluaron la relación de $1044\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$ del almidón de arroz y el almidón de vinaza. El almidón de arroz presentó una relación de menor (0.9039) que el almidón de vinaza (1.2102).

Tabla 5.3. Comparación en la relación $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida	Fermentación Ácido Láctica	Fermentación Sólida
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>A. oryzae var. oryzae</i>
	Absorbancia Relación $1047\text{ cm}^{-1} / 1022\text{ cm}^{-1}$		
0	0.68 ± 0.06^a	0.64 ± 0.03^e	0.64 ± 0.01^c
1		0.64 ± 0.02^e	
3		0.65 ± 0.03^d	
6		0.67 ± 0.03^c	
12	0.72 ± 0.04^a	0.72 ± 0.04^b	
18		0.76 ± 0.04^a	
24	$0.69 \pm 0.03^{a,b}$	0.78 ± 0.03^a	0.67 ± 0.01^b
48	0.70 ± 0.03^a		0.68 ± 0.02^b
72	0.69 ± 0.04^a		0.69 ± 0.01^a
96	$0.68 \pm 0.03^{a,b}$		0.73 ± 0.02^a
120	$0.66 \pm 0.03^{b,c}$		0.71 ± 0.01^a
144			0.70 ± 0.01^a
168	0.64 ± 0.04^c		0.70 ± 0.02^a
192			0.69 ± 0.01^a

Por lo tanto, el almidón de vinaza contiene una estructura más ordenada. En la Tabla 5.3 se puede observar que *L. bulgaricus* a mayor tiempo de fermentación obtiene almidones con estructuras más ordenadas.

5.5. Comparación de la Temperatura de Pico (T_p)

En la Tabla 5.4 se aprecian las comparaciones de la temperatura de pico de gelatinización (T_p) del AMF por los tres microorganismos en estudio con respecto al tiempo de fermentación. En este estudio se pudo observar que se retardo el proceso de gelatinización para los gránulos de AMF. La temperatura de gelatinización para *S. cerevisiae* fue de 2.37 °C (72 h) para *L. bulgaricus* y *A. oryzae* fue mayor de 2.56 (24 h) y 6.29 °C (192 h) respectivamente.

Tabla 5.4. Comparación de la Temperatura de pico (T_p).

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida	Fermentación Ácido Láctica	Fermentación Sólida
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>A. oryzae var. oryzae</i>
	T_p (°C)		
0	72.16 ± 0.26 ^c	72.16 ± 0.26 ^c	72.16 ± 0.26 ^{c,d}
1		71.54 ± 0.25 ^b	
3		72.62 ± 0.12 ^{a,b}	
6		73.29 ± 0.38 ^a	
12	71.45 ± 0.25 ^{b,c}	74.54 ± 0.42 ^a	
18		74.62 ± 0.25 ^a	
24	72.36 ± 0.10 ^{b,c}	74.72 ± 0.61 ^a	71.54 ± 0.25 ^d
48	73.72 ± 0.13 ^a		72.62 ± 0.12 ^c
72	74.53 ± 0.24 ^a		72.19 ± 0.38 ^c
96	74.12 ± 0.16 ^a		74.64 ± 0.38 ^b
120	74.06 ± 0.23 ^a		74.16 ± 0.42 ^b
144			75.72 ± 0.61 ^b
168	73.63 ± 0.12 ^{a,b}		77.74 ± 0.74 ^a
192			78.45 ± 0.73 ^a

Alonso-Gomez y col. (2016) mostraron un efecto similar al de la presente investigación, en el aumento de la temperatura de gelatinización empleando almidón de yuca fermentado. La T_P para el almidón de yuca sin fermentar fue de 63.48 °C aumentando a 64.49 °C a 30 días de fermentación y 67.03 °C en 45 días de fermentación. Los autores describen que el efecto es causado por el deterioro y debilitamiento de la conformación molecular del almidón durante la fermentación. Esto genera una re-cristalización de los gránulos de almidón lo cual provoca que el almidón este mejor estructurado y hace que el proceso de gelatinización sea más lento.

5.6. Viscosidad Aparente a 1 s⁻¹(Pas) de las Dispersiones Gelatinizadas

La comparación de la viscosidad aparente a 1.0 s⁻¹(Pas) se presenta en la Tabla 5.5. Se observa que la viscosidad es reducida cerca de un 16 % con *S. cerevisiae* y hasta un 31 % con *L. bulgaricus* en comparación con el control (0 h).

Sin embargo, con *A. oryzae* se obtienen geles débiles al disminuir hasta un 47 % en la viscosidad aparente con respecto a los geles de AMN conforme aumenta el tiempo de fermentación. En Canadá, el almidón modificado se utiliza a menudo en la formulación de yogur como estabilizador, para limitar defectos tecnológicos como la separación del suero (sinéresis) y las variaciones en la viscosidad (Gentès, 2016).

Tabla 5.5. Viscosidad Aparente a 1 s^{-1} (Pa s) de las Dispersiones Gelatinizadas.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentación Ácido Láctica <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Fermentación Sólida <i>A. oryzae var. oryzae</i>
	Viscosidad a 1.0 s^{-1} (Pa s)		
0	14.76 ± 0.23^a	8.48 ± 0.34^a	8.48 ± 0.35^a
1		6.83 ± 0.27^b	
3		4.40 ± 0.35^c	
6		$3.50 \pm 0.24^{c,d}$	
12	13.21 ± 0.35^a	2.98 ± 0.14^d	
18		2.73 ± 0.16^d	
24	$13.78 \pm 0.28^{a,b}$	$2.64 \pm 0.17^{d,e}$	$7.74 \pm 0.37^{a,b}$
48	12.23 ± 0.26^b		5.57 ± 0.19^c
72	11.27 ± 0.32^c		4.92 ± 0.21^d
96	9.65 ± 0.35^d		3.28 ± 0.24^e
120	$7.68 \pm 0.24^{d,e}$		2.42 ± 0.16^f
144			1.91 ± 0.14^g
168	6.97 ± 0.24^e		1.39 ± 0.38^g
192			1.37 ± 0.42^g

5.7. Potencial- ζ

La Tabla 5.6 indica los valores de potencial- ζ obtenidos para cada tratamiento en estudio. El potencial- ζ disminuye conforme aumenta el tiempo de fermentación para los tres casos en estudio. Un factor importante que se muestra en las imágenes de microscopía electrónica de barrido es la adhesión de los lactobacilos a los almidones, principalmente es llevado a cabo por interacciones electrostáticas. Delcour y col. (1999) describen que la pared celular de las bacterias ácido lácticas gram-positivas está conformada por peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, proteínas y polisacáridos. La disminución del potencial- ζ para el caso de la fermentación ácido láctica probablemente fue causada por el aumento en la disociación de

grupos ácido débiles de los polisacáridos de la pared celular y de la producción de ácido láctico generado, así como de las proteínas de la superficie (Schär-Zammaretti y Ubbink, 2003).

Por su parte, Crittenden y col. (2001) demostraron que algunas bacterias pueden adherirse al almidón *in vitro* (fuera de un organismo vivo). Sin embargo, el papel de la adhesión en el metabolismo del almidón por bifidobacterias es actualmente desconocido.

Los alimentos probióticos son alimentos con microorganismos vivos (lactobacilos) adicionados que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades suficientes, pueden tener efectos beneficiosos como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y potenciar el sistema inmune.

Tabla 5.6. Potencial- ζ de las fermentaciones evaluadas.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentación Ácido Láctica <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Fermentación Sólida <i>A. oryzae var. oryzae</i>
	Potencial- ζ (mV)		
Nativo	-17.20 ± 0.02	-15.12 ± 0.67 ^d	-15.0 ± 0.76 ^a
0	-33.26 ± 0.54 ^a		
1		-21.43 ± 0.75 ^c	
3		-23.71 ± 0.83 ^b	
6		-25.27 ± 0.81 ^{a,b}	
12	-35.55 ± 0.47 ^b	-30.25 ± 0.91 ^a	
18		-30.12 ± 0.87 ^a	
24	-44.76 ± 0.42 ^c	-28.68 ± 0.96 ^a	-16.30 ± 0.98 ^a
48	-45.75 ± 0.32 ^c		-17.40 ± 0.78 ^a
72	-44.65 ± 0.52 ^c		-19.50 ± 1.01 ^{a,b}
96	-42.65 ± 0.68 ^{c,d}		-22.40 ± 1.12 ^c
120	-38.75 ± 0.75 ^b		-23.30 ± 0.98 ^c
144			-26.80 ± 1.15 ^d
168	-37.93 ± 0.65 ^b		-30.70 ± 1.12 ^e
192			-31.60 ± 1.15 ^e

Otro enfoque para aumentar el número de bifidobacterias en la microbiota intestinal es mediante el uso de prebióticos, son una clase de alimentos funcionales, definidos como: “ingredientes no digeribles” que benefician al organismo, mediante el crecimiento o actividad de varias bacterias en el colon, mejorando la salud. Los prebióticos identificados hasta ahora son carbohidratos no digeribles, incluyendo lactulosa, inulina y una gama de oligosacáridos.

Algunos almidones (almidones resistentes) también escapan a la digestión completa a través del paso por el intestino delgado y llegan al colon como fuentes fermentables de carbohidratos para bacterias intestinales. Sin embargo, en modelos animales se ha demostrado que la inclusión de almidones resistentes en la dieta aumenta la población de bifidobacterias en el tracto intestinal. Por lo tanto, también se han propuesto a los almidones resistentes como posibles prebióticos Crittenden y col. (2001).

Se ha desarrollado recientemente una tecnología de microencapsulación que implica envolver bacterias en el núcleo hueco de almidón granular parcialmente hidrolizado, que se encapsula en un revestimiento exterior de amilosa (Myllarinen y col., 2000). Esta tecnología está diseñada para proteger a las bacterias probióticas de condiciones ambientales adversas durante el procesamiento, almacenamiento de los alimentos y durante el paso a través del tracto gastrointestinal superior.

5.8. Hidrólisis Ácida

En la tabla 5.7 se observa que en los tres casos evaluados conforme aumenta el tiempo de fermentación los gránulos de AMF fueron menos susceptibles a la hidrólisis ácida. Este parámetro identifica que *L. bulgaricus* modifica los gránulos de AMN produciendo gránulos altamente cristalinos con estructuras bien ordenadas y menos susceptibles a la hidrólisis ácida. Por lo tanto, se pueden estar generando almidones menos digeribles en 24 h de fermentación en comparación con las otras cepas evaluadas.

De acuerdo con la velocidad y la extensión de la digestión del almidón *in vitro*, el almidón se ha clasificado en tres fracciones principales: (1) almidón rápidamente digerible, que es la porción de almidón digerida en los primeros 20 min de incubación, (2) el almidón lentamente digerible, es la porción de almidón digerido de 20 a 120 min y (3) almidón resistente, la porción restante que no puede ser digerida más (Englyst y col., 1992).

Tabla 5.7. Hidrólisis ácida de las fermentaciones evaluadas.

Tiempo de Fermentación (h)	Fermentación Líquida <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentación Ácido Láctica <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Fermentación Sólida <i>A. oryzae var. oryzae</i>
	Hidrólisis Ácida (%)		
0	37.12 ± 2.02 ^a	36.96 ± 1.43 ^a	34.68 ± 1.23 ^a
1		28.78 ± 1.65 ^b	
3		25.83 ± 1.73 ^c	
6		19.18 ± 1.42 ^d	
12	31.92 ± 1.75 ^b	15.98 ± 1.59 ^e	
18		12.83 ± 1.43 ^{e,f}	
24	26.93 ± 1.57 ^c	9.37 ± 1.21 ^f	33.32 ± 1.02 ^a
48	23.72 ± 1.62 ^d		27.45 ± 1.11 ^b
72	19.73 ± 1.58 ^e		25.96 ± 0.98 ^b
96	17.56 ± 1.38 ^f		23.93 ± 0.87 ^b
120	16.96 ± 1.15 ^g		17.43 ± 1.01 ^c
144			15.94 ± 1.05 ^c
168	16.98 ± 0.93 ^h		12.10 ± 0.95 ^d
192			11.86 ± 0.87 ^d

Ao y col. (2007) obtuvieron almidones lentamente digeribles, los cuales proporcionan una liberación prolongada de glucosa (energía) junto con una respuesta glucémica baja. Por lo tanto, podría tener aplicación comercial como ingrediente saludable de alimentos procesados. Actualmente, no existen productos basados en almidón de digestión lenta comercializados en el mercado de alimentos.

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

El estudio de la caracterización fisicoquímica y morfológica de almidón de maíz empleado en fermentación con *S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* y *A. oryzae*, demostró que los cambios ocurridos en los gránulos de almidón poseen modificaciones que imparten resistencia, estabilidad y propiedades reológicas deseables.

La fermentación es un método viable para alterar la estructura de los gránulos de almidón de maíz.

En las tres fermentaciones evaluadas se aprecian cambios severos en las estructuras de los gránulos de almidón de maíz, logrando una desestabilización de la estructura hasta alcanzar rupturas severas. Estos cambios son atribuidos a las enzimas de tipo amilolíticas que producen los microorganismos empleados en este estudio (*S. cerevisiae*, *L. bulgaricus* y *A. niger*).

Estas enzimas hidrolizan preferentemente las regiones amorfas por ser de cadena lineal lo cual hace más fácil su ruptura, generando un mayor contenido de cristalinidad y una disminución de la sensibilidad a la hidrólisis ácida estricta, esto ocurrió para el caso de *S. cerevisiae* (38.40 % cristalinidad 168 h) y *L. bulgaricus* (37.32 % cristalinidad 24h). *A. oryzae* es capaz de generar el 39% de cristalinidad (96 h) en almidón de maíz.

Una ventaja adicional con respecto a las enzimas industriales se basa en la degradación del almidón *in situ* además del uso de cepas disponibles comercialmente para su uso en alimentos y tipo GRAS.

Por su parte, la fermentación ácido láctica posee una ventaja adicional, producir ácido láctico, este logra un efecto positivo en la digestibilidad ácida de gránulos de almidón, mejorando el contenido de fracciones de almidón resistentes.

Por otra parte, la fijación de hongos a la superficie del gránulo es un paso importante para conseguir una fermentación prolongada de los gránulos de almidón.

VI. Referencias

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877-902.
- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. 2006. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, 162(3), 143.
- Abouzieed, M.M., Reddy, C.A. 1986. Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 52(5), 1055-1059.
- Acuña-Argüelles, M., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. 1994. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, 16(1), 23-28.
- Adebowale, K. O., y Lawal, O. S. 2003. Functional properties and retrogradation behaviour of native and chemically modified starch of mucuna bean (*Mucuna pruriens*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(15), 1541-1546.
- Aggarwal, P., Dollimore, D. 1998. The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis. *Thermochimica Acta*, 324(1-2), 1-8.
- Aggarwal, P., Dollimore, D. 1998. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. *Thermochimica Acta*, 319(1-2), 17-25.
- Aghababaie, M., Beheshti, M., y Khanahmadi, M. 2014. Effect of temperature and pH on formulating the kinetic growth parameters and lactic acid production of *Lactobacillus bulgaricus*. *Nutrition and Food Sciences Research*, 1(1), 49-56.

-
-
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., y Guyot, J. P. 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihottivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6), 406-413.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. 2001. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 296-302.
- Albaek, M.O., Gernaey, K.V., Hansen, M.S., Stocks, S.M. 2011. Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1828-1840.
- Alonso-Gomez, L., Niño-López, A.M., Romero-Garzón, A.M., Pineda-Gomez, P., del Real-Lopez, A., Rodriguez-Garcia, M.E. 2016. Physicochemical transformation of cassava starch during fermentation for production of sour starch in Colombia. *Starch - Stärke*, 68(11-12), 1139-1147.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Décima tercera edición, Part. 16.023, Capitulo 16.
- Ao, Z., Simsek, S., Zhang, G., Venkatachalam, M., Reuhs, B. L., y Hamaker, B. R. 2007. Starch with a slow digestion property produced by altering its chain length, branch density, and crystalline structure. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55(11), 4540-4547.
- Ashraf, R., y Shah, N. P. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in yoghurt—A review. *International journal of food microbiology*, 149(3), 194-208.
-
-

- Bates, F. L., French, D., y Rundle, R. E. 1943. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation¹. *Journal of the American Chemical Society*, 65(2), 142-148.
- Beney, L., Martínez de Marañón, I., Marechal, P.-A., Gervais, P. 2000. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 275-279.
- Betiku, E., Adesina, O.A. 2013. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. *Biomass and Bioenergy*, 55, 350-354.
- Blazek, J., Gilbert, E.P. 2011. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 281-293.
- Blazek, J., Gilbert, E.P. 2010. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Native Starch Granule Structure. *Biomacromolecules*, 11(12), 3275-3289.
- Bothast, R. J., y Schlicher, M. A. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(1), 19-25.
- Bradley, D. E. 1954. Evaporated carbon films for use in electron microscopy. *British Journal of Applied Physics*, 5(2), 65.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85-112.

-
-
- Carlsen, M., Spohr, A.B., Nielsen, J., Villadsen, J. 1996. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(3), 266-276.
- Carrillo-Navas, H., Hernández-Jaimes, C., Utrilla-Coello, R. G., Meraz, M., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Viscoelastic relaxation spectra of some native starch gels. *Food Hydrocolloids*, 37, 25-33.
- Castillo Martínez, F.A., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Domínguez González, J.M., Converti, A., Oliveira, R.P.d.S. 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70-83.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A., Alves, T.L.M. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45-50.
- Clogston, J.D., y Patri, A. K. 2011. Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, 63-70.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., y Tang, M.C. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534.
- Couto, S.R., Sanromán, M.Á. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry— A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- Curran, K.A., Leavitt, J.M., Karim, A.S., Alper, H.S. 2013. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 15, 55-66.
- Crabb, W. D., y Mitchinson, C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, 15(9), 349-352.
-
-

-
-
- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., y Myllärinen, P. 2001. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3469-3475.
- Chen, P., Yu, L., Chen, L., Li, X. 2006. Morphology and Microstructure of Maize Starches with Different Amylose/Amylopectin Content. *Starch - Stärke*, 58(12), 611-615.
- Chen, G., y Zhang, B. 2012. Hydrolysis of granular corn starch with controlled pore size. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 316-320.
- Chiang, C. J., Yeh, G. L., Chen, P. T., Lin, T. H., Hwang, W. S., y Chao, Y. P. 2014. Development of a genomic engineering tool in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(1), 24-31.
- Chmelik, J., Krumlová, A., Budinska, M., Kruml, T., Psota, V., Bohacenko, I., ... y Vydrová, H. 2001. Comparison of size characterization of barley starch granules determined by electron and optical microscopy, low angle laser light scattering and gravitational field-flow fractionation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(1), 11-17.
- Datta, R., Henry, M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7), 1119-1129.
- Debet, M.R., Gidley, M.J. 2007. Why Do Gelatinized Starch Granules Not Dissolve Completely? Roles for Amylose, Protein, and Lipid in Granule “Ghost” Integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4752-4760.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., y Hols, P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 159-184.
-
-

- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wacher, C. 2003. Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amyolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4367-4374.
- Dura, A., Błaszczak, W., Rosell, C.M. 2014. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*, 101, 837-845.
- Durand, A. 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 113-125.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., y Cummings, J. H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European journal of clinical nutrition*, 46, S33-50.
- Falade, A.T., Emmambux, M.N., Buys, E.M., Taylor, J.R.N. 2014. Improvement of maize bread quality through modification of dough rheological properties by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Cereal Science*, 60(3), 471-476.
- Favela-Torres, E., Cordova-López, J., García-Rivero, M., Gutiérrez-Rojas, M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 33(2), 103-107.

- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E., Pérez-Álvarez, J.A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, 43(4), 931-942.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., y Pandey, A. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 107-115.
- Gallant, D., Derrien, A., Aumaitre, A., & Guilbot, A. 1973. In-Vitro Degradation of Starch-Studies by Transmission and Scanning Electron-Microscopy. *Starke*, 25(2), 56-64.
- Gallant, D.J., Bouchet, B., Baldwin, P.M. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32(3), 177-191.
- Genomes, K.K.E.o.G.a. 2013.
- Gentès, M. C., Turgeon, S. L., y St-Gelais, D. 2016. Impact of starch and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the properties of set and stirred yoghurts. *International Dairy Journal*, 55, 79-86.
- Gidley, M. J. 1989. Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation. *Macromolecules*, 22(1), 351-358.
- Green, B.J., Beezhold, D.H. 2011. Industrial Fungal Enzymes: An Occupational Allergen Perspective. *Journal of Allergy*, 2011, 11.
- Gutiérrez-Rojas, M., Auria, R., Benet Jean, C., Revah, S. 1995. A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 60(1), 189-198.
-
-

- Hermans, P. H., & Weidinger, A. (1948). Quantitative X-Ray Investigations on the Crystallinity of Cellulose Fibers. A Background Analysis. *Journal of Applied Physics*, 19(5), 491-506.
- Hesseltine, C.W. 1965. A Millennium of Fungi, Food, and Fermentation. *Mycologia*, 57(2), 149-197.
- Il'ina, A.V., Varlamov, V.P. 2004. Hydrolysis of Chitosan in Lactic Acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(3), 300-303.
- Imam, S.H., Harry-O'Kuru, R.E. 1991. Adhesion of *Lactobacillus amylovorus* to Insoluble and Derivatized Cornstarch Granules. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), 1128-1133.
- Jain, A., Morlok, C.K., Henson, J.M. 2013. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 905-917.
- Jariyasakoolroj, P., Chirachanchai, S. 2014. Silane modified starch for compatible reactive blend with poly(lactic acid). *Carbohydrate Polymers*, 106, 255-263.
- Jenkins, P. J., y Donald, A. M. 1998. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate research*, 308(1), 133-147.
- Jin, B., van Leeuwen, H.J., Patel, B., Yu, Q. 1998. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, 66(3), 201-206.

- Jo, A.R., Kim, H.R., Choi, S.J., Lee, J.S., Chung, M.N., Han, S.K., Park, C.-S., Moon, T.W. 2016. Preparation of slowly digestible sweet potato Daeyumi starch by dual enzyme modification. *Carbohydrate Polymers*, 143, 164-171.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for l-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41(4), 759-763.
- Kammoun, R., Naili, B., y Bejar, S. 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource technology*, 99(13), 5602-5609.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.-A. 1995. α -Amylase contained in bread can induce food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 95(1), 132-133.
- Kaur, B., Ariffin, F., Bhat, R., Karim, A.A. 2012. Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 398-404.
- Kim, H. Y., Lee, J. H., Kim, J. Y., Lim, W. J., y Lim, S. T. 2012. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch- Stärke*, 64(5), 367-373.
- Kotaka, A., Sahara, H., Hata, Y., Abe, Y., Kondo, A., Kato-Murai, M., Kuroda, K., Ueda, M. 2008. Efficient and Direct Fermentation of Starch to Ethanol by Sake Yeast Strains Displaying Fungal Glucoamylases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1376-1379.
- Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
-
-

- Lacerda, L., Filho, M.d.S.C., Demiate, I., Bannach, G., Ionashiro, M., Schnitzler, E. 2008. Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal α -amylase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93(2), 445-449.
- Lee, M. K., Uhm, Y. R., Rhee, C. K., and Lee, Y. B. 2010. Organic Suspension Behavior of Rutile TiO₂ Nanoparticles with High Specific Surface Area. *Materials transactions*, 51(12), 2157-2161.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Li, M.-C., Ge, X., Cho, U.R. 2013. Emulsion grafting vinyl monomers onto starch for reinforcement of styrene-butadiene rubber. *Macromolecular Research*, 21(5), 519-528.
- Li, M.-C., Lee, J.K., Cho, U.R. 2012. Synthesis, characterization, and enzymatic degradation of starch-grafted poly(methyl methacrylate) copolymer films. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(1), 405-414.
- Li, H., Jiao, A., Wei, B., Wang, Y., Wu, C., Jin, Z., Tian, Y. 2013. Porous starch extracted from Chinese rice wine vinasse: Characterization and adsorption properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 156-159.
- Li, M.-C., Cho, U.R. 2013. Effectiveness of coupling agents in the poly (methyl methacrylate)-modified starch/styrene-butadiene rubber interfaces. *Materials Letters*, 92, 132-135.
- Li, W., Li, C., Gu, Z., Qiu, Y., Cheng, L., Hong, Y., Li, Z. 2016. Retrogradation behavior of corn starch treated with 1,4- α -glucan branching enzyme. *Food Chemistry*, 203, 308-313.

- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>.*
- Lopez- Rubio, A., Flanagan, B. M., Gilbert, E. P., y Gidley, M. J. 2008. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. *Biopolymers*, 89(9), 761-768.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
- McCullough, A.J. 2011. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *Journal of Digestive Diseases*, 12(5), 333-340.
- Miladinov, V.D., Hanna, M.A. 2000. Starch esterification by reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*, 11(1), 51-57.
- Mitchell, D.A., von Meien, O.F., Krieger, N., Dalsenter, F.D.H. 2004. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17(1), 15-26.
- Morris, V.J., Gunning, A.P., Faulds, C.B., Williamson, G., Svensson, B. 2005. AFM Images of Complexes between Amylose and *Aspergillus niger* Glucoamylase Mutants, Native and Mutant Starch Binding Domains: A Model for the Action of Glucoamylase. *Starch - Stärke*, 57(1), 1-7.

- Myllarinen, P., Forssell, P., Von Wright, A., Alander, M., Mattila-Sandholm, T., y Poutanen, K. 2000. Starch capsules containing microorganisms and/or polypeptides or proteins and a process for producing them. *F1104405 (WO9952511A1)*.
- Narong, P., James, A.E. 2006. Effect of pH on the ζ -potential and turbidity of yeast suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 274(1–3), 130-137.
- Neri, D.F.M., Balcão, V.M., Costa, R.S., Rocha, I.C.A.P., Ferreira, E.M.F.C., Torres, D.P.M., Rodrigues, L.R.M., Carvalho Jr, L.B., Teixeira, J.A. 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115(1), 92-99.
- Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., Pronk, J. 2013. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 398-404.
- Nigam, P., Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778.
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., Yanase, H. 2011. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 273-277.
- Omar, N.B., Ampe, F., Raimbault, M., Guyot, J.-P., Tailliez, P. 2000. Molecular Diversity of Lactic Acid Bacteria from Cassava Sour Starch (Colombia). *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 285-291.
- Pak, D., Koo, O. K., Story, R. S., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Lee, S. O., y Ricke, S. C. 2013. Acridine orange as an alternative to optical density to study growth kinetics of

- Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(6), 512-515.
- Palma- Rodriguez, H. M., Agama- Acevedo, E., Mendez- Montealvo, G., Gonzalez- Soto, R. A., Vernon- Carter, E. J., & Bello- Pérez, L. A. 2012. Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch- Stärke*, 64(2), 115-125.
- Pandey, A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27(2), 109-117.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153-1169.
- Parada, J., Aguilera, J.M. 2011. Review: Starch Matrices and the Glycemic Response. *Food Science and Technology International*. 17 (3), 187-204.
- Pelletier Christophe, Cayuela Chantal, Bouttier Sylvie, Bourlioux Pierre and Bellon-Fontaine Marie-Noëlle. Cell Surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 3 (5) 1725-1731.
- Perry, G.H., Dominy, N.J., Claw, K.G., Lee, A.S., Fiegler, H., Redon, R., Werner, J., Villanea, F.A., Mountain, J.L., Misra, R., Carter, N.P., Lee, C., Stone, A.C. 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*, 39(10), 1256-1260.
- Puncha-arnon, S., Uttapap, D. 2013. Rice starch vs. rice flour: Differences in their properties when modified by heat–moisture treatment. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 85-91.
-
-

- Quirce, S., Cuevas, M., Díez-Gómez, M.L., Fernández-Rivas, M., Hinojosa, M., González, R., Losada, E. 1992. Respiratory allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in bakers' asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90(6), 970-978.
- Reddy, C.K., Suriya, M., Haripriya, S. 2013. Physico-chemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris.L*) starch by enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 220-226.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V. 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnology Advances*, 26(1), 22-34.
- Rhee, S.J., Lee, J.-E., Lee, C.-H. 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*, 10(1), S5.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
- Scazzina, F., Del Rio, D., Pellegrini, N., Brighenti, F. 2009. Sourdough bread: Starch digestibility and postprandial glycemic response. *Journal of Cereal Science*, 49(3), 419-421.
- Schär-Zammaretti, P., y Ubbink, J. 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85(6), 4076-4092.
- Shiby, V.K., Mishra, H.N. 2013. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 482-496.

- Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H., Kondo, A. 2004. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 5037-5040.
- Shrestha, A.K., Blazek, J., Flanagan, B.M., Dhital, S., Larroque, O., Morell, M.K., Gilbert, E.P., Gidley, M.J. 2012. Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of maize starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 23-33.
- Shrestha, A.K., Blazek, J., Flanagan, B.M., Dhital, S., Larroque, O., Morell, M.K., Gilbert, E.P., Gidley, M.J. 2015. Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of extruded maize and high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 118, 224-234.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., y Pandey, A. 2006. α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 173-184.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., y Pandey, A. 2007. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *Journal of Scientific y Industrial Research*. 66, 621-626.
- Sugai-Guérios, M.H., Balmant, W., Krieger, N., Furigo Junior, A., Mitchell, D.A. 2016. Colonization of solid particles by *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation involves two types of penetrative hyphae: A model-based study on how these hyphae grow. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 173-182.
-
-

- Sujka, M., Jamroz, J. 2013. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 413-419.
- Tai, M., Stephanopoulos, G. 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. *Cereal Chem*, 67(6), 558-563.
- Teste, M. A., François, J. M., y Parrou, J. L. 2010. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 26815-26824.
- Topping, D. L., y Clifton, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81(3), 1031-1064.
- Tran, U. T., Okadome, H., Murata, M., Homma, S., y Ohtsubo, K. I. 2001. Comparison of Vietnamese and Japanese rice cultivars in terms of physicochemical properties. *Food Science and Technology Research*, 7(4), 323-330.
- Utrilla-Coello, R.G., Hernández-Jaimes, C., Carrillo-Navas, H., González, F., Rodríguez, E., Bello-Pérez, L.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J. 2014. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 103, 596-602.
- Van Der Maarel, M. J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., y Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
-
-

- van Soest, J. J., Tournois, H., de Wit, D., y Vliegenthart, J. F. 1995. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 279, 201-214.
- van Zyl, W.H., Bloom, M., Viktor, M.J. 2012. Engineering yeasts for raw starch conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1377-1388.
- Velikova, P., Stoyanov, A., Blagoeva, G., Popova, L., Petrov, K., Gotcheva, V., Angelov, A., Petrova, P. 2016. Starch utilization routes in lactic acid bacteria: New insight by gene expression assay. *Starch - Stärke*, 68(9-10), 953-960.
- Vernon- Carter, E. J., Bello- Pérez, L. A., Lobato- Calleros, C., Hernández- Jaimes, C., Meraz, M., & Alvarez- Ramirez, J. 2016. Morphological, rheological and in vitro digestibility characteristics of gelatinized starch dispersion under repeated freeze- thaw cycles. *Starch- Stärke*, 68(1-2), 84-91.
- Viniegra-González, G. 2014. New Horizons for the Production of Industrial Enzymes by Solid-State Fermentation. in: *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*, (Eds.) R. Guevara-Gonzalez, I. Torres-Pacheco, Springer International Publishing. Cham, pp. 319-340.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*, 97(14), 1583-1591.
- Wang, Y.-J., Truong, V.-D., Wang, L. 2003. Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 52(3), 327-333.

- Wokadala, O.C., Emmambux, N.M., Ray, S.S. 2014. Inducing PLA/starch compatibility through butyl-etherification of waxy and high amylose starch. *Carbohydrate Polymers*, 112, 216-224.
- Wösten, H.A.B. 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 625-646.
- Wriessnegger, T., Pichler, H. 2013. Yeast metabolic engineering – Targeting sterol metabolism and terpenoid formation. *Progress in Lipid Research*, 52(3), 277-293.
- Yangcheng, H., Jiang, H., Blanco, M., Jane, J.-I. 2013. Characterization of Normal and Waxy Corn Starch for Bioethanol Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 379-386.
- Yang, Q., Hui, X.-G., Qiang, Y., Hua, L.-X. 2016. Improvement in corn flour applicability using lactic acid fermentation: A mechanistic study. *Starch - Stärke*, 68, 1-9.
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., y Tabata, S. 2004. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 271(16), 3414-3420.
- Zhang, C., Zhu, L., Shao, K., Gu, M., Liu, Q. 2013. Toward underlying reasons for rice starches having low viscosity and high amylose: physiochemical and structural characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1543-1551.
- Zhang, G., Ao, Z., Hamaker, B.R. 2006. Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. *Biomacromolecules*, 7 (11), 3252-3258.

Zhang, G., Hamaker, B.R. 2009. Slowly Digestible Starch: Concept, Mechanism, and Proposed Extended Glycemic Index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(10), 852-867.

Zhang, T., Li, X., Chen, L., Situ, W. 2016. Digestibility and structural changes of waxy rice starch during the fermentation process for waxy rice vinasse. *Food Hydrocolloids*, 57, 38-45.

Zhu, Y., Tramper, J. 2013. Koji – where East meets West in fermentation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1448-1457.

VII. Perspectivas

Las importancias de los estudios de caracterización de distintos tipos de almidón han sido ampliamente investigadas, sin embargo, como se ha enfatizado en este trabajo los estudios de caracterización fisicoquímica de las modificaciones de almidón de maíz mediante el uso de fermentación no han sido estudiados a profundidad. Este trabajo muestra tener una aplicación biotecnológica eficiente en la producción de alimentos.

Es por esto que se sugiere profundizar en el estudio de las modificaciones estructurales de almidón de maíz empleando la fermentación.

Cuantificar las actividades enzimáticas producidas por los microorganismos nos permitirá hacer una relación de la degradación de almidón en función a la actividad específica de cada enzima.

La relación del contenido de amilosa y amilopectina presente en el almidón de maíz durante la fermentación es otro parámetro que en un futuro pudiera ser determinado.

Por otra parte, es conveniente realizar estudios de modelamiento molecular para evaluar las interacciones entre la amilosa y amilopectina presentes en el almidón con los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos (por ejemplo, enzimas, etanol, ácido láctico, lactato, entre otros).

Otro parámetro importante es la cuantificación de biomasa (células, esporas, etc.) durante el proceso de fermentación.

VIII. Trabajos Derivados de la Tesis

Publicaciones

Reyes Isabel, Cruz-Sosa Francisco, Román-Guerrero Angélica, Vernon-Carter Jaime y Álvarez-Ramírez José. 2016. **Structural changes of corn starch during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation.** *Starch-Stärke*. 68: 961-971. DOI 10.1002/star.201600088.

Reyes Isabel, Cruz-Sosa Francisco, Meraz Mónica, Vernon-Carter Jaime y Álvarez-Ramírez José. 2016. **Physicochemical changes of corn starch during lactic acid fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*.** (Trabajo enviado a la revista *Journal of Food Science and Technology*. 19 de diciembre del 2016).

Reyes Isabel, Cruz-Sosa Francisco, Hernández Jaimes Carmen, Vernon-Carter Jaime y Álvarez-Ramírez José. 2016. **Effect of solid-state fermentation (*Aspergillus oryzae* var. *oryzae*) in physicochemical properties of corn starch.** (Trabajo Enviado a la revista *Starch - Stärke*. 7 de enero del 2017).

Anexos

RESEARCH ARTICLE

Structural changes of corn starch during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

Isabel Reyes¹, Francisco Cruz-Sosa¹, Angelica Roman-Guerrero¹, E. Jaime Vernon-Carter² and Jose Alvarez-Ramirez²

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Iztapalapa, Mexico

²Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Iztapalapa, Mexico

Native corn starch (NCS) dispersions (3% w/v) were inoculated with native (*i.e.*, not genetically modified) *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^7 cells mL⁻¹), fermented for 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, and 168 h at 38°C. It was found that glucoamylases, the amylolytic enzymes produced by native *S. cerevisiae*, produced morphological changes in the fermented corn starch (FCS) granules by attacking in a first stage the fractures around the Malta cross. In the long-term (96 h and higher times), the starch granules were broken down into fragments of different sizes. The FCS dispersions were centrifuged and the precipitates were subjected to different analyses. XRD analysis indicated that while the crystallinity of the unfermented NCS was 32.82%, crystallinity progressively increased to a maximum of 40.94% for the FCS after 96 h. The FTIR absorbance ratio $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ remained nearly unchanged during the first 96 h of fermentation, suggesting that the short-range crystallinity linked to double-helices was unaffected. Thermal analysis data showed that FCS exhibited gelatinization temperature range and enthalpy maxima after 96 h of fermentation. The FCS obtained at different fermentation times, were subjected to stringent hydrolysis conditions. Longer fermentation times resulted in diminished hydrolysis percentage of FCS. Overall, the results of this work show that the fermentation of NCS with native *S. cerevisiae* for given specific times can induce structural changes in the fermented granules, leading to positive improvement of some properties, such as increased crystallinity, lower susceptibility to hydrolysis, and enhanced thermal properties.

Received: March 3, 2016
Revised: March 27, 2016
Accepted: March 28, 2016

Keywords:

Corn starch fermentation / Crystallinity / Native *S. cerevisiae* / Structural changes

1 Introduction

Starch, a natural, renewable, and sustainable material, is rarely used in its native form. For adjusting its properties, starch is commonly subjected to a huge diversity of morphological and functional modifications. The objective of the modifications is to induce ad hoc changes in the physicochemical properties of the starch to be used in a wide domain of applications. Among

the chemical modifications widely used are silylation [1], carbamation [2], esterification [3], etherification [4], polymer grafting [5, 6], and acidic hydrolysis [7]. Given the potential hazards in the consumption of foodstuffs containing chemically modified starch, physical treatments have been proposed as a reliable alternative. Studies have shown that ultrasound influenced the functional properties of starch causing an increase of fat and water absorption, lower gelling concentration (except potato starch), solubility and swelling power, and a decrease of starch paste viscosity [8]. Heat-moisture treatment affected thermal parameters of gelatinization and gel hardness of starches [9].

Enzymatic treatment has been considered in the recent years for starch modification because of the high specificity

Correspondence: Dr. Jose Alvarez-Ramirez, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa 09340, Mexico

E-mail: jjar@xanum.uam.mx

Fax: +52-55-58044650

Abbreviations: ATR, attenuated total reflectance; FCS, fermented corn starch; NCS, Native corn starch; RDS, rapidly digestible starch; RS, resistant starch; SDS, slowly digestible starch

Color online: A colour version of the publication can be viewed online.

of the enzymatic action. For instance, fungal α -amylase or amyloglucosidase have been used for obtaining porous starch granules at sub-gelatinization temperature [10]. Also, dual enzyme (glycogen branching enzyme and amylo-sucrase) treatment has been proposed for obtaining slowly digestible starch [11]. It has been shown that treatment with 1,4- α -glucan branching enzyme is able to retard the short- and long-term retrogradation of corn starch [12]. The combined modification by enzymatic hydrolysis and thermal treatment of starch increased the formation of resistant starch (RS), showing an increase in water absorption and water solubility indexes and a decrease in swelling power [13]. Recently, the evolution of the molecular, mesoscopic, and microscopic structure of corn starch granules treated with amylase digestion was reported [14, 15], showing that the hydrolysis process is controlled by restricted diffusion of enzymes within the granular microstructure.

The use of enzymes for starch treatment is highly efficient and specific, with important potential in industrial applications. A drawback of the use of enzyme for starch treatment is the cost increments that might be prohibitive for competitive applications. Likewise, it has been argued that residual enzymes (*e.g.*, amylases) in foodstuffs might cause consumers to suffer respiratory allergy and dermatitis side effects [16–18]. In this way, accurate design and tight control of food processing involving industrial enzymes is commonly required. An alternative to the use of industrial enzymes relies on the treatment with natural enzymes carried by flours or in situ produced by modified fungal and yeast strains. It has been shown that fungal and yeast enzymes of rice leaven can increase the adsorption capacity [19], and modify the digestibility and crystallinity of residual rice starch granules [20]. Eventually, the modified rice starch can be used for encapsulating probiotics or as food additive for reducing the metabolic syndrome [21]. Although natural (*i.e.*, native) yeast can produce a rich diversity of enzymes, the production rate is usually too slow for industrial applications. In this regard, engineered yeast strains have been proposed for accelerating starch modification [22]. Surface-engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and α -amylase has been explored for the direct production of ethanol from native corn starch [23]. Further applications include biofuel [24], terpenoid [25], and muconic acid production [26], among many others. However, the use of genetically engineered yeast strains in food matrices should be handled with some care given the lack of a complete understanding of potential side effects [17, 18, 27]. Besides, most consumers prefer products tagged as natural and organic, in which genetically modified components were not involved in their manufacture.

Yeast strains, mainly native *Saccharomyces cerevisiae* tagged as a generally recognized as safe (GRAS) medium by the Food and Drug Administration (FDA), are widely used in the food industry for the production of bread and brewing

products. *S. cerevisiae* makes use of available sugars (*e.g.*, maltose and sucrose) for producing alcohol and CO₂. Specifically, *S. cerevisiae* is used for stable ethanol production and baking around the world, but lacks the full range of amylolytic enzymes, mainly α - and β -amylase, involved in the breakage of starch chains to glucose. As a matter of fact, yeast has only two genes for amylases; namely, YII099W (SGA1) and YIR019C (FLO11, MUC1, and STA4), and both are α -glucoamylases (EC:3.2.1.3) [28]. Besides, the production of α -glucoamylases is relatively slow to be used in fast-processing of food products.

Under the presence of insoluble starch chains and sugar deficiency, native *S. cerevisiae* is able to undergo a relatively slow adaptation for producing α -glucoamylases, and, in this way, to break down the starch chain to produce an accessible substrate (*e.g.*, glucose). It is interesting to note that the molecular mechanisms underlying starch chain degradation by α -glucoamylases are not clear at all, and only recently have been studied from the theoretical standpoint [29]. On the other hand, fast production of amylolytic enzymes should lead to liquefaction of starch dispersions as the starch chains are quickly broken down. This is a desirable feature for, *e.g.*, ethanol production at industrial scales where the sugar availability is often the limiting step in the reaction pathway.

Recently, Shrestha *et al.* [14, 15] studied the structural evolution of corn starch granules induced by amylase enzymes. In contrast, the aim of this work was to evaluate the evolution of the morphological, structural, and functional properties of corn starch granules, under more slow modification rates, as those induced the α -glucoamylases of native *S. cerevisiae* at sub-gelatinization temperature of 38°C (*i.e.*, optimum growth temperature for *S. cerevisiae*).

2 Materials and methods

2.1 Materials

A commercial native *S. cerevisiae* strain (Saftbrew s-33; emulsifier E491, Fermentis, Marcq-en-Barceul, France) was used for fermentation. This yeast strain was not genetically engineered, so that the strain does not have the ability of producing amylase. Native corn starch (NCS; S-4126, amylose content of $25.03 \pm 0.62 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Yeast extract, peptone and dextrose (BD BIOXON, Mexico City, Mexico), and hydrochloric acid (36.5–38.0% HCl basis ACS reagent; product no. H7020, Sigma–Aldrich) were also employed. Deionized water was used in all experiments.

2.2 Inoculum preparation

For inoculum preparation, 1 g of dry yeast was hydrated in 10 mL of deionized water. Yeast extract, peptone and dextrose

(YPD) culture medium (10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ peptone, and 20 g L⁻¹ dextrose) was placed in shake flasks (250 mL) adjusting the pH to 4.5. The medium was incubated at 38°C and 200 rpm overnight, yielding 1×10^{-7} cells mL⁻¹. Aliquots from this culture were used to inoculate starch fermentation trials.

2.3 Fermentation conditions

8 Erlenmeyer flasks (250 mL) containing native corn starch (NCS; 3% w/v) dispersions were inoculated with 2×10^7 cells mL⁻¹ of the *S. cerevisiae*. The flasks were gently stirred in a shaking water bath at 200 rpm, at 38°C for up to 168 h. The NCS and fermented corn starch (FCS_x) samples were withdrawn at different times (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, and 168 h; x stands for fermentation time), and centrifuged (6000 × g) for 10 min. The precipitates were oven-dried at 30°C until constant weight was achieved (~24 h), put into desiccators with a silica-gel bed at the bottom as adsorbent, until required for analysis.

2.4 Polarized light microscopy and droplet size

Polarized light microscopy was used to examine the morphology of NCS and FCS_x dispersed in deionized water (3% w/v). Samples were placed on viewing slides, upon which cover slips were gently placed. An Olympus BX45 microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used and images were captured with Carl Zeiss AxioCam ERc 5s camera. The mean number-length diameter ($\bar{d}_{1,0}$) of the NCS and FCS_x was estimated by image analysis of the dispersions micrographs by means of the Zen-2012 software package (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Selected micrographs at 100× are shown.

2.5 Scanning electron microscopy (SEM)

A JSM-7600F model scanning electron microscope (Jeol Co., Ltd., Tokyo, Japan) with the LM mode at 15 kV accelerating voltage was used to investigate the microstructural properties of the NCS and FCS_x. The samples were mounted on carbon sample holders using double-side sticky tape and sputtered with about 20 nm of gold using a Denton Vacuum DESK IV device. Micrographs at 5000× magnification are presented.

2.6 X-ray diffraction (XRD)

A Bruker-AXS Model D8 Advance diffractometer (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany) coupled to an X-ray diffraction copper anode tube was used to obtain the X-ray diffraction patterns of the NCS and FCS_x which were recorded with a scintillation counter. A nickel filter selected the Cu K_α radiation ($\lambda = 1.543$) and a secondary beam graphite monochromator was operated at 35 kV and 25 mA. Intensities were measured in

the 10–30° diffraction angle range with a 0.03° step size and measuring time of 0.6 s per point.

2.7 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The infrared spectra of NCS and FCS_x were recorded on an FTIR spectrophotometer (PerkinElmer FT-IR Spectrometer Frontier). The samples were then subjected to attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy in the range of 1200–900 cm⁻¹.

2.8 Thermal characterization

The thermal properties of the NCS and FCS_x dispersions (5 w/v) in deionized water were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) (TA Instruments, Q1000, New Castle, DE, USA) previously calibrated with indium. Samples (2.5 mg) were hermetically closed in aluminum pans and heated in a calorimeter from 25 to 150°C at constant rate 10°C min⁻¹. An empty aluminum pan was used as reference. Temperatures (T_o – onset, T_p – peak, T_c – conclusion) and enthalpy of thermal transitions (ΔH , J g⁻¹) were determined with the use of instrument's software Universal Analysis 2000 (New Castle, DE, USA).

2.9 Apparent viscosity

NCS and FCS_x gelatinized dispersions were prepared by dispersing the 5% w/v of precipitate in deionized water. The dispersions were gently stirred and heated at 90°C for 20 min to allow complete gelatinization of the starch granules. The gelatinized dispersions were then cooled down to room temperature. The apparent viscosity of NCS and FCS_x dispersions was determined with a dynamic oscillatory Kinexus Pro rheometer (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK), with a cone-plate geometry, in which the rotating cone was 40 mm in diameter, and cone angle of 4° with a gap of 0.15 mm. About 1.6 mL of sample was carefully placed in the measuring system, and left to rest for 10 min at 25°C for structure recovery and temperature equilibration. Flow curves of the gelatinized dispersions were determined by applying an increasing shear rate from 0.1 to 100 s⁻¹ and the apparent viscosity at a shear rate of 1 s⁻¹ is reported.

2.10 ζ-potential

The ζ-potential of NCS and FCS_x dispersions (1% w/v) in deionized water was measured with a Zetasizer-Nano ZS (Malvern, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK).

2.10 Acidic hydrolysis

NCS and FCS_x (15 g, dry basis) were dispersed by stirring in an aqueous hydrochloric acid solution (100 mL, 1M), and

kept at 38°C. After 2 h, the reaction was stopped by cooling down at 4°C and centrifuging at 6000g for 10 min for recovering non-hydrolyzed material. The precipitates were washed in deionized water until neutral pH was reached, air-dried at 35°C for 24 h, and stored in a sealed glass container at 4°C. The hydrolysis conversion was computed as the percent of precipitated and dried solids relative to the initial starch solids.

2.11 Statistical analysis

Analyses were carried out in triplicates from three independent experiments carried out using a randomized experimental design. Data were subjected to simple classification analysis of variance and to Tukey's means comparison analysis. Significance was established at $p < 0.05$. Data analysis were done using SAS software 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

3 Results and discussion

Figure 1 presents the growth curve of the *S. cerevisiae* culture after 12 h (overnight) propagation. The growth kinetics showed a typical S-shaped profile, with a lag phase lasting about 2 h and a maximum cell population of about 13.0×10^7 counts mL^{-1} . The cells were harvested in the late log phase and used for inoculating the corn starch dispersions (3% w/v).

3.1 Morphology

Figure 2a–c presents polarized light microscopy images of corn starch granules at increasing fermentation times. NCS (Fig. 2a) exhibited a typical ellipsoidal morphology where the Malta cross is clearly delineated. The FCS_{24h} (Fig. 2b) shows

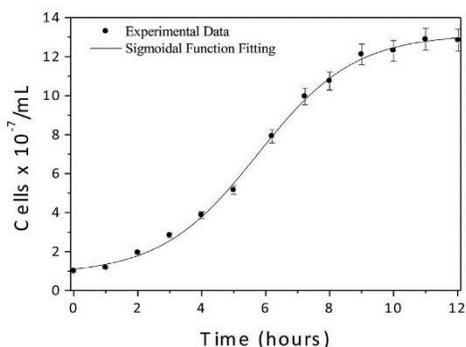


Figure 1. Overnight growth kinetics of *S. cerevisiae* used for the fermentation of corn starch granules.

that fractures appear around the Malta cross, whose definition commences to blur, and erosion at the granule circumference is noticed. Figure 2c shows that for the FCS_{48h} granules deeper fractures about the Malta cross region were developed. This morphological effect cannot be attributed to granule swelling since the fermentation took place at sub-gelatinization temperature (38°C). Images of granules (not shown) in the absence of *S. cerevisiae* using the same processing conditions (time, temperature, and stirring), did not show fractures or severe disruption as in Fig. 2c. As fermentation time proceeded, FCS_{96h} granules became highly disrupted, losing structural integrity, and the Malta cross is no longer discernible (Fig. 2d). After 120 h of fermentation, the FCS_{120h} granules became fully fragmented (Fig. 2e).

SEM images also permitted to monitor the morphological changes induced by *S. cerevisiae* fermentation on the corn starch granules. Figure 2f illustrates the shape of unfermented NCS granules, showing a clear definition of the hilum (*i.e.*, organization center) linked to the Malta cross. The granule surface is relatively smooth without visible fractures or erosion. The FCS_{24h} granule appears as a deflated balloon (Fig. 2g), and after 48 h fermentation (FCS_{48h}) fractures and eroded regions are appreciated (Fig. 2h). In Fig. 2i it can be seen that the integrity of the FCS_{96h} was further disrupted, with more by severe erosion and fractures taking place, leading to a formation of a porous network evidenced as small holes in the granule surface. Similar erosion patterns were obtained for rice starch granules subjected to the amylolytic action by natural enzymes from rice leaven [20]. Figure 2j shows that FCS_{120h} granules became fragmented. In fact, Fig. 2j shows a granule fragment that appeared as a shell of the original structure.

Native starch granules are complex structures formed by radially oriented amorphous growth and semicrystalline regions organized about the hilum. While most part of the starch granule seems to be a robust structure with smooth surface, the hilum appears commonly as a relatively disorganized region with some fractures, displaying the Malta cross under polarized light images. Images in Fig. 2 indicated that the granule disruption by the *S. cerevisiae* fermentative action started around the hilum fractures, which are the less organized region of the native starch granule. After an adaptation period, *S. cerevisiae* was able to produce α -glucoamylases that attacked this vulnerable region located around the Malta cross. Although the granule surface was also eroded by the amylolytic enzyme, the amorphous growth regions within the granule body are more susceptible to degradation by α -glucoamylases. The fracture passing through the hilum in native starch granule allowed the diffusion of amylolytic enzymes [30]. Eventually, at relatively long fermentation times, the starch granule is cracked down, leaving only a sort nut shell. The activity of the native *S. cerevisiae* offers a slow degradation of the corn

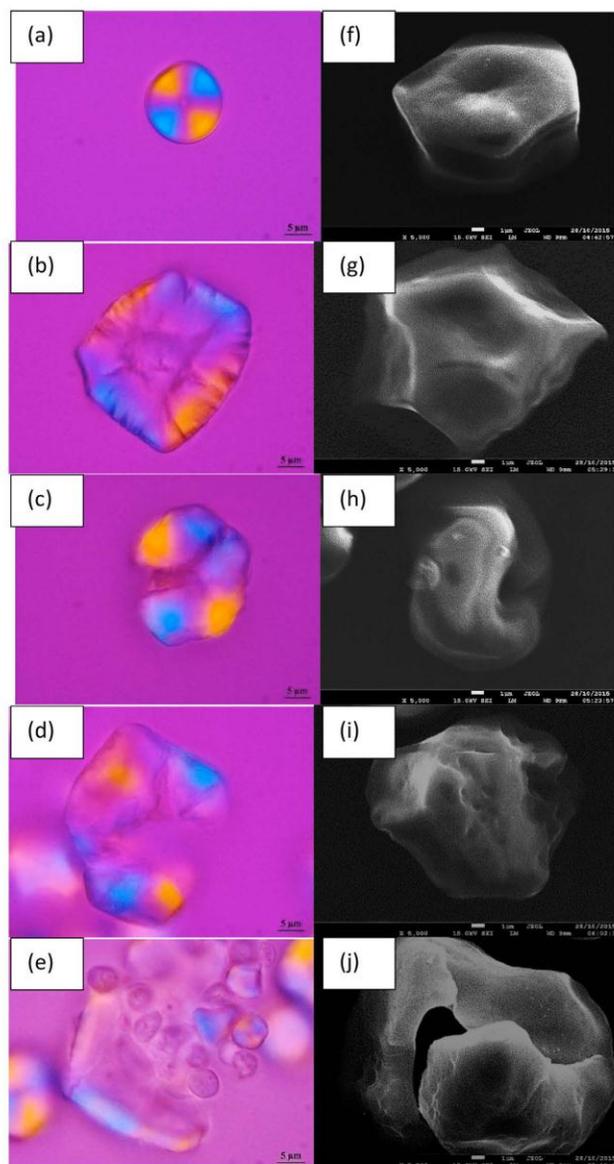


Figure 2. (a)–(e) Polarized light microscopy and (f)–(j) SEM images of native (a) and fermented corn starch granules (24, 48, 96, and 120 h) with native *S. cerevisiae*.

starch granule, lasting about 190 h. In contrast, direct amylase activity is much faster, with starch hydrolysis reaching about 90% within 8 h [14, 15]. In addition, diffusion-controlled superficial and porous erosions are the dominating mechanisms involved in the degradation of starch granules by amylase activity (Fig. 2 in [14]).

3.2 Mean number-length diameter ($d_{1,0}$)

Erosion and fracture of FCS granules led to important changes in their size. To evaluate these changes, the mean number-length diameter (*i.e.*, linear diameter) was monitored. The results are shown in the first column of Table 1.

Table 1. Physicochemical and morphological changes of corn starch granules produced by *S. cerevisiae* fermentation time

Fermentation time (h)	$d_{1,0}$ (μm)	Crystallinity (%)	Absorbance ratio 1022/1047	ζ -Potential (mV)	Viscosity at 1.0 s^{-1} (Pa s)	Two-hours acid hydrolysis (%)
0	17.31 ± 0.73^a	32.82 ± 1.50^a	0.68 ± 0.06^a	-33.26 ± 0.54^a	14.76 ± 0.23^a	37.12 ± 2.02^a
12	17.27 ± 0.72^a	33.20 ± 1.26^b	0.72 ± 0.04^a	-35.55 ± 0.47^b	13.21 ± 0.35^a	31.92 ± 1.75^b
24	17.12 ± 0.81^a	37.99 ± 1.65^b	$0.69 \pm 0.03^{a,b}$	-44.76 ± 0.42^c	$13.78 \pm 0.28^{a,b}$	26.93 ± 1.57^c
48	16.68 ± 1.32^a	$38.13 \pm 1.77^{b,c}$	0.70 ± 0.03^a	-45.75 ± 0.32^c	12.23 ± 0.26^b	23.72 ± 1.62^d
72	$16.06 \pm 1.65^{a,b}$	39.28 ± 1.56^c	0.69 ± 0.04^a	-44.65 ± 0.52^c	11.27 ± 0.32^c	19.73 ± 1.58^e
96	15.28 ± 1.72^b	40.94 ± 1.58^c	$0.68 \pm 0.03^{a,b}$	$-42.65 \pm 0.68^{c,d}$	9.65 ± 0.35^d	17.56 ± 1.38^f
120	14.51 ± 1.86^b	$39.14 \pm 1.49^{c,d}$	$0.66 \pm 0.03^{b,c}$	-38.75 ± 0.75^d	$7.68 \pm 0.24^{d,e}$	16.96 ± 1.15^g
168	$13.09 \pm 1.56^{b,c}$	38.40 ± 1.56^d	0.64 ± 0.04^c	-37.93 ± 0.65^d	6.97 ± 0.24^e	16.96 ± 0.93^h

Means (\pm standard deviation) in a column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

The diameter decreased as the fermentation time increased as consequence of surface erosion and granule fragmentation induced by amylolytic enzymes. The size reduction was accompanied by increasingly large standard deviations, reflecting the diversity of granular structures formation. Interestingly, the largest standard deviations occurred within a fermentation time interval of about 72–120 h, which corresponds more or less to the severe erosion, fracture and fragmentation phenomena observed around the hilum region in Fig. 2c–e.

3.3 Changes in crystallinity during fermentation

X-ray diffractions patterns are shown in Figure 3. Native corn starch exhibited a typical A-type XRD pattern, with main peaks at 15.12, 17.17, 18.05, and 23.0 2θ -degrees [31]. The FCS_x showed the same XRD pattern, indicating that the starch crystalline structure was not altered by the fermentative action of the *S. cerevisiae*. The change of the relative

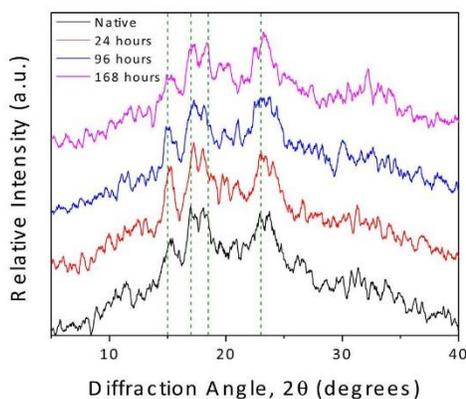


Figure 3. X-ray diffraction patterns for native and fermented corn starch (24, 96, and 168 h) with native *S. cerevisiae*. Vertical lines denote distinctive peaks of Type-A crystallinity.

crystallinity of the NCS and FCS_x is presented in the second column of Table 1. The crystallinity of the NCS was about 32.82% and increased to a maximum value for FCS_{96h}, and decreasing with further fermentation time to 38.40% after 168 h of fermentation. The initial increase in crystallinity with fermentation time supports the postulate that α -glucoamylases produced by the *S. cerevisiae* attacked preferably the amorphous regions of the starch granule. Similar results were reported by Zhang et al. [32], showing that crystallinity of treated starch with α -amylase and amyloglucosidase increased slightly. Also, Li et al. [19] showed that amylolytic enzymes from rice leaven increased the crystallinity of rice starch. It was suggested that although α -amylase simultaneously attacks the crystalline and amorphous regions, the latter is more susceptible to amylolytic digestion than the former [14]. In this sense, the evolution of the crystallinity under the slow activity of *S. cerevisiae* showed a behavior similar to that exhibited when direct treatment with amylase was considered.

It has been pointed out that *S. cerevisiae* is capable of producing glucoamylases [28], which can hydrolyze the terminal 1,4-linked α -D-glucopyranosyl residues from the non-reducing ends and 1,6- α -D-glycoside bonds at the branching points of starch molecules. The specific activity of glucoamylase toward the 1,4-linkage is much higher than for the 1,6-linkage [33]. The amorphous regions of the starch granules are composed mainly by amylose chains and the branching point regions of the amylopectin chains. Amylose chains are found in the central part of the granule and between the crystal lamellae. On the other hand, the crystalline regions are composed by double helices packed into crystalline lattices [34]. In the early stage of the fermentation, the amorphous regions in the central regions (*i.e.*, hilum) were hydrolyzed by glucoamylases, leading to break down and fragmentation of starch granules (Fig. 2). As a consequence, the fractured granules were more susceptible to enzymatic hydrolysis of the inner amorphous regions, leading to increased crystallinity content. In the long term, after about 120 h of fermentation, the crystalline regions

were also largely affected by enzymatic fragmentation, which produced a slight decrease of the relative crystallinity. A similar pattern of crystallinity change was observed for acidic hydrolysis of corn starch [7] where H_2SO_4 (3.6 M, 35°C) hydrolyzed primarily the amorphous regions to achieve a maximum crystallinity content of about 42.5% within the first 2–3 days of treatment. Blazek and Gilbert [35] have pointed out that the existence of granular pores and channels and physical penetrability of the amorphous growth ring affect the accessibility of the enzyme to the substrate. Enzymatic or acidic hydrolysis enlarged the porous network of the granule (Fig. 2i), which in turn enhanced the transport of the hydrolyzing agent, hence the increased rate starch chain fragmentation.

3.4 FTIR analysis

Figure 4 presents the FTIR spectra in the range 1200–900 cm^{-1} of NCS and FCS_x . The IR absorbance bands at 1047 and 1022 cm^{-1} are linked to crystalline and amorphous structures of starch, respectively. In this way, the absorbance ratio 1047 cm^{-1} /1022 cm^{-1} has been proposed as an index of the ordered crystalline domains to amorphous domains in starch. The third column in Table 1 presents the variation of the absorbance ratio 1047 cm^{-1} /1022 cm^{-1} with the fermentation time. The absorbance ratio of $\text{FCS}_{12\text{h}}$ showed a slight increase respect that of NCS, but $\text{FCS}_{24\text{h}}$ showed a slight decrease respect that of $\text{FCS}_{12\text{h}}$. Absorbance ratio remained stabilized at about 0.69 up to 96 h fermentation time ($\text{FCS}_{96\text{h}}$), showing a steady decrease at longer fermentation times, reaching a value of 0.64 for $\text{FCS}_{168\text{h}}$, which was even smaller than that displayed by the NCS. While XRD patterns reflect the long-range ordering of crystalline packing, the absorbance ratio 1047 cm^{-1} /1022 cm^{-1} reflects mainly the short-range order

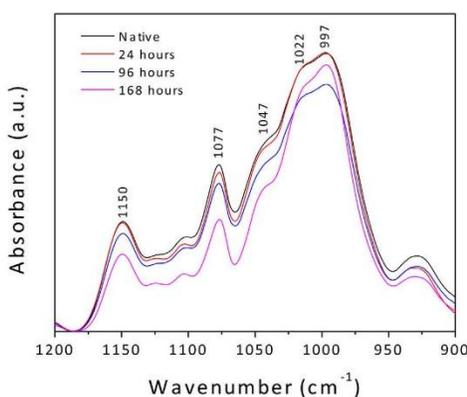


Figure 4. FTIR diffraction patterns native and fermented corn starch (24, 96, and 168 h) with native *S. cerevisiae*.

by double-helices arrangements. The results in Table 1 suggest that in the first stage, the amylolytic enzymes produced by native *S. cerevisiae* were unable to destroy the compactly packed double-helices structures, focusing mainly on the linear and branched chains available in the hilum fractures. As the granule structure was severely disrupted, the double-helix structures were exposed to the attack of α -glucoamylases. This effect was reflected as an important decrease in the absorbance ratio of $\text{FCS}_{120\text{h}}$ and $\text{FCS}_{168\text{h}}$.

3.5 Thermal properties

Endothermic flow patterns of NCS and FCS_x are shown in Fig. 5. The NCS showed a gelatinization peak temperature of about 71.5°C, which is in the range of reported values for normal corn starch [36]. As indicated in the Sub-Section 2.3., the FCS_x were oven-dried at 30°C for 24 h until constant weight was achieved, meaning that the samples also contained *S. cerevisiae* cells. Although the yeast is inactive after drying, it has the ability of recovering its activity under suitable conditions. In this way, the yeast exhibited a thermal response that combined with the thermal response of FCS granules. Figure 5 also presents the endothermic flow pattern of pure yeast dispersion, showing two temperature peaks at about 55.0 and 105.0°C. The meaning of these peaks is not clear at all since the thermal properties of yeast dispersions have not been systematically studied. The second peak could be reflecting the lysis of *S. cerevisiae*, starting at about 90°C and ending at about 105°C. On the other hand, the first endothermic peak could be reflecting the process of activation-inactivation of *S. cerevisiae* as function of temperature. Beney et al. [37] found that a slow linear increase (not higher than 0.5°C/min) from 25 to 50°C allowed an increase in the thermo-tolerance of *S. cerevisiae* at 50°C. Further

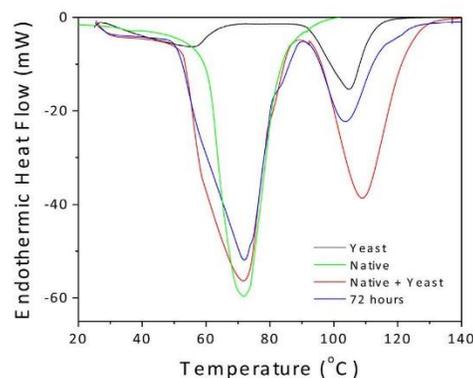


Figure 5. Endothermic flow patterns for yeast, native corn starch, native corn starch + yeast, and fermented corn starch (72 h) with native *S. cerevisiae*.

temperature rising induced a fast increase of yeast mortality. It is apparent that the first endothermic peak was the result of the yeast activation and the subsequent deactivation mechanism. Although this is an interesting issue deserving detailed analysis, it is beyond the scope of this work.

Figure 5 also presents the endothermic flow pattern for NCS + *S. cerevisiae* cells. The yeast presence modified the endothermic flow pattern, although the gelatinization peak temperature was not affected. The first peak endothermic area was enlarged to the left by the yeast presence, masking in this form the temperature onset. Interestingly, the conclusion temperature was not affected since the onset temperature of the second yeast peak was far beyond the endset temperature of the starch dispersion. A tight computation of the thermal properties should consider the effect of the yeast contained in the dried starch sample. As a rough approach, it can be considered that the yeast culture during fermentation achieved a nearly constant population. By doing this, the thermal properties of the NCS and FCS_x are presented in Table 2. The results showed that the melting temperature range $T_c - T_o$ increased as the fermentation time increased ($p > 0.95$), reflecting that the fermented starch granules exhibited a more heterogeneous morphology than NCS (Fig. 2). The gelatinization enthalpy also increased with the fermentation time, indicating that the structure of the residual FCS_x granules was more ordered than that of the NCS. Even though, the gelatinization enthalpy showed a slight decrease after 120 h, indicating the deterioration of the internal ordering. Utrilla-Coello et al. [7] found a parabolic relationship between gelatinization enthalpy and relative crystallinity for corn starch hydrolyzed with H₂SO₄ (3.6 M, 35°C). The fragmentation of the starch granules induced by the hydrolysis generated a large amount of granular fragments and debris with a diversity of crystalline structures, reflected by the wider gelatinization temperature range. In the long-term, after about 120 h of fermentation time, the structures were refined by the further action of amylolytic enzymes in double-helices packs.

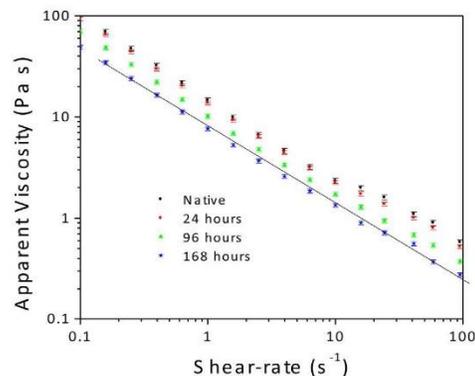


Figure 6. Apparent viscosity as function of the shear rate for native and fermented corn starch (24, 96, and 168 h) with native *S. cerevisiae*.

3.6 Apparent viscosity

The apparent viscosity-shear rate response of NCS and FCS_x gelatinized starch dispersions (5% w/v) are presented in Fig. 6. The apparent viscosity decayed with the shear rate, indicating a typical shear-thinning behavior of the starch gels. The apparent viscosity experimental behavior within the shear rate range studied was described by a power-law function $\eta_{app} = K_n \gamma^{n-1}$, where γ is the shear-rate, K_n is the flow consistency index, and n is the flow behavior index ($n = 1$ for Newtonian fluids and $n < 1$ for shear-thinning fluids). The fitting ($R^2 = 0.96$) of the experimental data showed that $n = 0.71 \pm 0.02$ for all cases.

During gelatinization, amylose and amylopectin chains are leached out from granules, forming a highly viscous continuous matrix. Insoluble remnants, called ghosts, become dispersed in the continuous matrix, forming a microstructure with complex rheological response [38]. The apparent viscosity exhibited by gelatinized starch dispersions

Table 2. Evolution of the thermal properties of fermented corn starch at different times with *S. cerevisiae*

Fermentation time (h)	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	$T_c - T_o$ (°C)	ΔH (J/g)
Native	57.65 ± 0.32 ^a	72.16 ± 0.26 ^a	86.13 ± 0.92 ^a	27.91 ± 0.25	7.65 ± 0.31 ^a
12	57.02 ± 0.45 ^b	71.45 ± 0.25 ^b	86.17 ± 0.53 ^a	29.15 ± 1.17	7.54 ± 0.34 ^a
24	55.35 ± 0.33 ^b	72.36 ± 0.10 ^{ab}	84.42 ± 0.45 ^b	29.07 ± 0.87	9.68 ± 0.66 ^b
48	56.98 ± 0.58 ^{ab}	73.72 ± 0.13 ^c	88.65 ± 0.89 ^c	31.67 ± 1.16	8.88 ± 0.58 ^{ab}
72	55.34 ± 0.74 ^b	74.53 ± 0.24 ^c	89.80 ± 0.42 ^c	34.56 ± 0.76	11.35 ± 0.36 ^c
96	57.55 ± 0.34 ^a	74.12 ± 0.16 ^c	92.53 ± 0.15 ^d	34.98 ± 0.86	12.85 ± 0.47 ^d
120	58.86 ± 0.91 ^c	74.06 ± 0.23 ^c	89.32 ± 0.34 ^c	30.46 ± 1.12	11.14 ± 0.76 ^{cd}
168	58.27 ± 0.83 ^c	73.63 ± 0.12 ^{bc}	91.78 ± 0.41 ^{cd}	32.51 ± 0.78	10.36 ± 0.54 ^{cd}

T_o , onset temperature; T_p , peak temperature; T_c , conclusion temperature; ΔH , enthalpy; ΔT ($T_c - T_o$), gelatinization temperature range. Means (± standard deviation) in a column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

depends strongly on chain length and ramifications degree of leached starch chains. In particular, the reduction of short-chain amylose affects largely the viscosity of starch gels [39]. The results in Fig. 6 indicate that the fermentation by native *S. cerevisiae* affected the configuration starch chains via enzymatic hydrolysis. That is, amylolytic enzymes led to a partial fragmentation of starch chains, which in turn produced weaker gels with reduced apparent viscosity.

3.7 ζ -potential

NCS exhibited a negative ζ -potential of relatively small magnitude (about -17.2 mV). NCS + *S. cerevisiae* displayed a ζ -potential magnitude of about -33.26 mV. Narong and James [40] reported ζ -potential values of about -12.0 mV for yeast at pH 7. The ζ -potential of dispersions reflects surface chemical properties and interaction between particles. In this way, the difference of the ζ -potential value for mixed yeast-starch dispersions suggests weak electrostatic interactions between yeast and starch granules. Table 1 presents the ζ -potential values of NCS and FCS₂. At low ζ -potential values, there is a tendency of yeast cells to aggregate into compact colonies [40]. In the early fermentation stages, the ζ -potential values steadily increased to a maximum value of -45.75 mV after 48 h of fermentation (FCS_{48h}), that remained non-significantly different up to 96 h of fermentation, reflecting an increase in the double layer repulsion term. In this way, the yeast compact colonies were disaggregated, allowing them cover larger granules surface area, reaching more easily the Malta cross fractures, and causing a more extensive break down of the starch granules (Fig. 2). Longer fermentation times (120–168 h) caused a significant decrease in the ζ -potential values that are puzzling, but might have been caused by a shielding effect due to positive surface charges carried by the increasing proliferation of fragmented structures and debris formed.

3.8 Acidic hydrolysis

The results of the acidic hydrolysis advance (HCl 1.0 M, 38°C) after 2 h are presented in Table 1. The NCS presented a hydrolysis advance of about 37.12%, which decreased to a constant value of about 17.0% for FCS_{120h} and FCS_{168h} (Table 1). These results are in close agreement with those found for the crystallinity percentage (Table 1). In fact, crystalline structures are less susceptible to attack by acidic and enzymatic digestion. Zhang et al. [20] found that incubation with amylolytic enzymes changed the digestibility properties of rice starch by decreasing the fraction of rapidly digestible starch (RDS), increasing the fraction of slowly digestible starch (SDS). The side-by-side digestion mechanism [41] states that granules of A-type starches contain channels connecting the central region to the granule surface. During fermentation, the enzymes migrate into the starch granules through channels to

initiate hydrolysis (preferably at amorphous regions). The limited acidic hydrolysis of starch arose as consequence of granules fragments with increased crystallinity and reduced porosity. Under these conditions, the rate of acidic hydrolysis is limited by the transport of protons inside the starch structure.

4 Conclusions

This work explored the use of native (*i.e.*, not genetically engineered) *S. cerevisiae* strain for modifying the microstructure of corn starch granules. The underlying idea was that native *S. cerevisiae* is limited to the slow rate production of α -glucoamylases in such way that the hydrolysis of starch chains can be carried out under controlled conditions. A further advantage over industrial enzymes relies on costs since native *S. cerevisiae* strains are commercially available everywhere at inexpensive prices. The incubated starch granules were analyzed with FTIR, XRD, and DSC methods to show that amylolytic enzymes from native *S. cerevisiae* hydrolyze preferably the amorphous regions of starch granules, resulting in increased crystallinity content and reduced susceptibility to stringent acidic hydrolysis. These features were also reflected in the apparent viscosity of gelatinized starch dispersions, which showed a reduction of around 50% after 120 h of fermentation. Overall, the results reported in this work suggested that the use of standard yeast strains is a viable way to modify the microstructure of starch granules oriented to digestibility and viscosity of starch pastes.

5 Author contributions

I. Reyes (Ph.D. Student) performed most part of experimental runs. F. Cruz-Sosa studied the capability of native *S. cerevisiae* to produce α -glucoamylase. A. Roman-Guerrero analyzed yeast growth kinetics and experimental results. E.J. Vernon-Carter designed the experimental runs. J. Alvarez-Ramirez proposed the idea of using yeast strains for safe modification of starch granules. All authors were involved in the writing of the manuscript.

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the partial financing of this work through Grant #236500.

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Jariyasakoolroj, P., Chirachanchai, S., Silane modified starch for compatible reactive blend with poly (lactic acid). *Carbohydr. Polym.* 2014, 106, 255–263.

- [2] Li, M. C., Cho, U. R., Effectiveness of coupling agents in the poly (methyl methacrylate)-modified starch/styrene-butadiene rubber interfaces. *Mater. Lett.* 2013, *92*, 132–135.
- [3] Miladinov, V. D., Hanna, M. A., Starch esterification by reactive extrusion. *Ind. Crops Prod.* 2000, *11*, 51–57.
- [4] Wokadala, O. C., Emmambux, N. M., Ray, S. S., Inducing PLA/starch compatibility through butyl-etherification of waxy and high amylose starch. *Carbohydr. Polym.* 2014, *112*, 216–224.
- [5] Li, M. C., Lee, J. K., Cho, U. R., Synthesis, characterization, and enzymatic degradation of starch-grafted poly (methyl methacrylate) copolymer films. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012, *125*, 405–414.
- [6] Li, M. C., Ge, X., Cho, U. R., Emulsion grafting vinyl monomers onto starch for reinforcement of styrene-butadiene rubber. *Macromol. Res.* 2013, *21*, 519–528.
- [7] Utrilla-Coeillo, R. G., Hernández-Jaimes, C., Carrillo-Navas, H., González, F., Rodríguez, E., et al., Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydr. Polym.* 2014, *103*, 596–602.
- [8] Sukja, M., Jamroz, J., Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocolloids* 2013, *31*, 413–419.
- [9] Pancha-arron, S., Uttapap, D., Rice starch vs. rice flour: Differences in their properties when modified by heat-moisture treatment. *Carbohydr. Polym.* 2013, *91*, 85–91.
- [10] Dura, A., Blaszczyk, W., Rosell, C. M., Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydr. Polym.* 2014, *101*, 837–845.
- [11] Jo, A. R., Kim, H. R., Choi, S. J., Lee, J. S., et al., Preparation of slowly digestible sweet potato Daeyumi starch by dual enzyme modification. *Carbohydr. Polym.* 2016, *143*, 164–171.
- [12] Li, W., Li, C., Gu, Z., Qiu, Y., et al., Retrogradation behavior of corn starch treated with 1, 4- α -glucan branching enzyme. *Food Chem.* 2016, *203*, 308–313.
- [13] Reddy, C. K., Suriya, M., Haripriya, S., Physico-chemical and functional properties of resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*. L) starch by enzymatic method. *Carbohydr. Polym.* 2013, *95*, 220–226.
- [14] Shrestha, A. K., Blazek, J., Flanagan, B. M., Dhital, S., et al., Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of maize starch granules. *Carbohydr. Polym.* 2012, *90*, 23–33.
- [15] Shrestha, A. K., Blazek, J., Flanagan, B. M., Dhital, S., et al., Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of extruded maize and high amylose maize starches. *Carbohydr. Polym.* 2015, *118*, 224–234.
- [16] Quirce, S., Cuevas, M., Díez-Gómez, M. L., Fernández-Rivas, M., et al., Respiratory allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in bakers' asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, *90*, 970–978.
- [17] Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A., α -Amylase contained in bread can induce food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995, *95*, 132–133.
- [18] Green, B. J., Beezhold, D. H., Industrial fungal enzymes: An occupational allergen perspective. *J. Allergy* 2011, article ID 682574, 11.
- [19] Li, H., Jiao, A., Wei, B., Wang, Y., et al., Porous starch extracted from Chinese rice wine vinasse: Characterization and adsorption properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, *61*, 156–159.
- [20] Zhang, T., Li, X., Chen, L., Situ, W., Digestibility and structural changes of waxy rice starch during the fermentation process for waxy rice vinasse. *Food Hydrocolloids* 2016, *57*, 38–45.
- [21] McCullough, A. J., Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *J. Dig. Dis.* 2011, *12*, 333–340.
- [22] Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., Pronk, J., Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, *24*, 398–404.
- [23] Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., et al., Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, *70*, 5037–5040.
- [24] Tai, M., Stephanopoulos, G., Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* 2013, *15*, 1–9.
- [25] Wriessnegger, T., Pichler, H., Yeast metabolic engineering – Targeting sterol metabolism and terpenoid formation. *Prog. Lipid Res.* 2013, *52*, 277–293.
- [26] Curran, K. A., Leavitt, J. M., Karim, A. S., Alper, H. S., Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2013, *15*, 55–66.
- [27] Hansen, M., *Genetically Engineered Food: Make Sure It's Safe and Label It. Genetically Modified Organisms in Agriculture*, Academic Press, San Diego, CA, USA 2001, pp. 239–255.
- [28] KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 2013, <http://www.genome.jp.Kegg/Kegg2/html> (accessed on February 20, 2016).
- [29] Morris, V. J., Gunning, A. P., Faulds, C. B., Williamson, G., Svensson, B., AFM images of complexes between amylose and *Aspergillus niger* glucoamylase mutants, native and mutant starch binding domains: A model for the action of glucoamylase. *Starch/Stärke* 2005, *57*, 1–7.
- [30] Chen, P., Yu, L., Chen, L., Li, X., Morphology and microstructure of maize starches with different amylose/ amylopectin content. *Starch/Stärke* 2006, *58*, 611–615.
- [31] Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., Starch granules: Structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 1998, *23*, 85–112.
- [32] Zhang, G., Ao, Z., Hamaker, B. R., Slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules* 2006, *7*, 3252–3258.
- [33] van Zyl, W. H., Bloom, M., Viktor, M. J., Engineering yeasts for raw starch conversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, *95*, 1377–1388.
- [34] Blazek, J., Gilbert, E. P., Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydr. Polym.* 2011, *85*, 281–293.
- [35] Blazek, J., Gilbert, E. P., Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. *Biomacromolecules* 2010, *11*, 3275–3289.
- [36] Yangcheng, H., Jiang, H., Blanco, M., Jane, J. L., Characterization of normal and waxy corn starch for bioethanol production. *J. Agric. Food Chem.* 2013, *61*, 379–386.
- [37] Beney, L., de Maranon, I. M., Marechal, P. A., Gervais, P., Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of

Starch/Stärke 2016, 68, 961–971

the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol* 2000, 55, 275–279.

[38] Debet, M. R., Gidley, M. J., Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4752–4760.

[39] Zhang, C., Zhu, L., Shao, K., Gu, M., Liu, Q., Toward underlying reasons for rice starches having low viscosity and

Corn starch changes by *S. cerevisiae* fermentation 971

high amylose: Physiochemical and structural characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 2013, 93, 1543–1551.

[40] Narong, P., James, A. E., Effect of pH on the ζ -potential and turbidity of yeast suspensions. *Colloids Surf., A* 2006, 274, 130–137.

[41] Zhang, G., Hamaker, B. R., Slowly digestible starch: Concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009, 49, 852–867.

*“Dios no te hubiera dado la capacidad de soñar
sin darte también la posibilidad de convertir
tus sueños en realidad”*

Hector Tassinari



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00179

Matrícula: 2131800767

Transformaciones
Morfológicas y Físicoquímicas
de Almidón de Maíz por
Fermentación con
Saccharomyces cerevisiae,
Lactobacillus delbrueckii subsp.
bulgaricus y *Aspergillus oryzae*
var. *oryzae*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 1 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ
DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO
DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ
DRA. MARIA DEL CARMEN HERNANDEZ JAIMES



MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

VOCAL

DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO

VOCAL

DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ

SECRETARIO

DRA. MARIA DEL CARMEN HERNANDEZ
JAIMES