

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

---

---



**CASA ABIERTA AL TIEMPO**

**PRODUCCION DE DIACETILO Y OTROS COMPUESTOS  
AROMATIZANTES RELACIONADOS, POR BACTERIAS LACTICAS  
EN CULTIVOS AXENICOS MIXTOS A BASE DE MAIZ**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A:**

**MARIA DE LOURDES AURORA ESCAMILLA HURTADO**

**Enero, 2000**

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio Núm. PFP-200-93.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DISERTACION PUBLICA

5

DENOMINACION DE LA TESIS

PRODUCCION DE DIACETILO Y OTROS COMPUESTOS AROMATIZANTES RELACIONADOS, POR BACTERIAS LACTICAS EN CULTIVOS AXENICOS MIXTOS A BASE DE MAIZ.

En México, D.F. se presentaron a las 12:00 horas del día 27 del mes de ENERO del año 2000 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Comité del Posgrado.

DR. JORGE SORIANO SANTOS;  
DRA. SARA VALDES MARTINEZ;  
DR. GUSTAVO FIDEL GUTIERREZ LOPEZ;  
DR. LEOBARDO SERRANO CARREON Y  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última se reunieron a la presentación de la Disertación Pública para la obtención del Grado de

Doctora en: CIENCIAS BIOLOGICAS

de: MARIA DE LOURDES AURORA ESCAMILLA HURTADO

quien presentó una tesis producto de una investigación original cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Comité resolvieron:

APROBARLA

Acto continuo, el Presidente del Comité comunicó a la interesada el resultado y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARIA DE LOURDES AURORA ESCAMILLA HURTADO  
FIRMA DE LA INTERESADA

REVISO

DR. ANTONIO AGUILAR AGUILAR  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

  
DR. JOSE LUIS ARREDONDO FIGUEROA  
DIRECTOR DE DIVISION

PRESIDENTE

  
DR. JORGE SORIANO SANTOS

SECRETARIA

  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

VOCAL

  
DRA. SARA VALDES MARTINEZ

VOCAL

  
DR. GUSTAVO FIDEL GUTIERREZ LOPEZ

VOCAL

  
DR. LEOBARDO SERRANO CARREON

**Producción de diacetilo y otros compuestos aromatizantes relacionados, por bacterias lácticas en cultivos axénicos mixtos a base de maíz.**

M.L. Escamilla<sup>1</sup>, J. Soriano<sup>1</sup>, S.E. Valdés<sup>2</sup> y A. Tomasini<sup>1</sup>. 1) Dept. Biotecnología. D.C.B.S. U. Iztapalapa. UAM. 2) F.ES. Cuautitlan. U.N.A.M.

Se determinaron las condiciones para producir diacetilo con *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus acidophilus* desarrollándose en un medio semisólido a base de maíz. El diacetilo es el principal componente del aroma a mantequilla, complementándose con los ácidos grasos volátiles (A.G.V.). Se determinó el efecto de algunos factores en la producción de diacetilo y consumo de almidón en sistemas modelos a base de almidón, estructurados como series de cultivos axénicos con diseños factoriales simplificados. *Pd. pentosaceus* produjo 63.3 mg/l de diacetilo y *Lb. acidophilus* consumió 26.6 g/l de almidón en medios adicionados con glucosa, extracto de levadura y CaCO<sub>3</sub>, a 28°C. En cultivos mixtos en medios semisólidos a base de maíz, la máxima producción de diacetilo (779.6 mg/Kg) fue a las 12 h. También se produjeron: lactato, 0.665 g/Kg, y A.G.V. totales, 1 312 mg/Kg. Para el pretratamiento de maíz se seleccionaron: la nixtamalización, 20 min; molienda y tamizado por malla 40; desengrasado; cocimiento, 25 min; y una relación inicial *Pd. pentosaceus* / *Lb. acidophilus*, 3:1. *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* presentaron actividades amilolíticas ligadas a sus paredes celulares: 47.3 y 6.16 U/l, respectivamente. *Lb. acidophilus* tuvo además una actividad extracelular de 4 187.3 U/l. El producto aromatizado tiene un interés potencial para la industria alimentaria.

**Production of diacetyl and other related aroma compounds by lactic acid bacteria in axenic mixed cultures in corn-based media.**

M.L. Escamilla-Hurtado<sup>1</sup>, J. Soriano-Santos<sup>1</sup>, S.E. Valdés-Martínez<sup>2</sup> and A. Tomasini-Campocosió<sup>1</sup>.

1. Dept. Biotecnología. Div. C.B.S. U. Iztapalapa. Univ. Autónoma Metropolitana.
2. Facultad de Estudios Superiores. Cuautitlán. U.N.A.M.

The conditions for diacetyl production with *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* growing in a corn-based semisolid medium were determined. Diacetyl is the main compound in the butter aroma, being complemented with the volatile fatty acids (V.F.A.). The effect of some factors upon the production of diacetyl and starch consumption were determined in starch based model systems, structured as series of axenic cultures with simplified factorial designs. *Pd. pentosaceus* produced diacetyl, 63.3 mg/l, and *Lb. acidophilus* consumed starch, 26.6 g/l, in cultures with added glucose, yeast extract and CaCO<sub>3</sub>, at 28°C. In corn-based mixed cultures, the maximum diacetyl production (779.6 mg/Kg) was at 12 h. Lactate and total V.F.A. (0.665 g/Kg and 1 312 mg/Kg, respectively) were also produced. Selected factors for corn pretreatment were: lime-treatment, 20 min; grinding and sieving through mesh 40; defatting; cooking, 25 min; and *Pd. pentosaceus* / *Lb. acidophilus* initial ratio, 3:1. *Pd. pentosaceus* and *Lb. acidophilus* presented cell wall-linked amylolytic activities, 47.3 and 6.16 U/l, respectively. *Lb. acidophilus* had also an extracellular activity of 4,187.3 U/l. The obtained aromatic product has a potential interest to the food industry.

## RESUMEN

El principal objetivo del trabajo fue determinar las condiciones que favorecen significativamente la producción de diacetilo en un cultivo mixto de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus acidophilus* Hansen 1748, desarrollándose en un medio semisólido a base de maíz. Considerando que el diacetilo es el principal componente en el complejo aroma a mantequilla, el producto obtenido podría ser utilizado en el desarrollo de extensores aromatizados para la industria alimentaria.

Para este fin se llevaron a cabo series de cultivos sumergidos a base de almidón como sistemas modelos de fermentación. Estas series fueron estructuradas como arreglos ortogonales simplificados: L16, L8 y L8, respectivamente, de acuerdo a la metodología de Taguchi. Se determinaron los efectos de diversos factores de cultivo sobre los cambios de concentración de almidón y diacetilo, y sobre la actividad amilolítica extracelular, a los 5 días de fermentación. En los cultivos axénicos de la 1ª y 2ª series, *Pd. pentosaceus* produjo más diacetilo (63.27 mg/l) al añadir glucosa, extracto de levadura y CaCO<sub>3</sub>, a 28°C; pero el consumo de almidón fue mayor (18.4 g/l) en ausencia de glucosa. *Lb. acidophilus* no produjo diacetilo, aunque consumió más almidón (26.56 g/l) a 28°C, con adición de CaCO<sub>3</sub>, glucosa y extracto de levadura. Su actividad amilolítica extracelular (10 077 U/l) se favoreció a

35°C. En los cultivos mixtos de la 3ª serie se consumió poco almidón debido al bajo pH, no obstante, la concentración de diacetilo se incrementó a 135.76 mg/l a 32°C.

Posteriormente se llevaron a cabo dos series de cultivos mixtos en medios semisólidos a base de maíz (humedad: 78%,  $a_w \geq 0.995$ ), usando diseños factoriales L8 de Taguchi, y aplicando las condiciones previamente seleccionadas. En la 1ª serie se evaluó el efecto de diversas condiciones de pretratamiento de maíz en las producciones de diacetilo, del ácido butírico y del ácido láctico por *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* cultivados durante 5 días, a 32°C. Las condiciones de pretratamiento de maíz seleccionadas fueron: nixtamalización por 20 min; molienda y tamizado para dar un tamaño de partícula < 0.42 mm (malla 40); desengrasado con hexano y cocimiento por 25 min. En la 2ª serie se evaluaron algunas condiciones de cultivo en la producción de diacetilo. Las condiciones seleccionadas fueron: la adición de extracto de levadura y la inoculación con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* en una relación de 3:1. Estas condiciones produjeron hasta 311.6 mg/kg de diacetilo, 359 mg/Kg de ácido butírico y 2.28 g/Kg de ácido láctico. En estos sistemas complejos de maíz no se evaluó la actividad amilolítica, pero el consumo de almidón fue de 54.8 g/Kg.

Se llevó a cabo otro cultivo en medio de maíz en las condiciones seleccionadas para determinar los parámetros cinéticos del cultivo. Durante las 120 h de cultivo predominaron las bacterias lácticas, pero como los medios de cultivo no se esterilizaron, se observaron también *Bacillus* spp. y Enterobacterias nativas que pudieron contribuir con el consumo de almidón y la producción de ácido grasos

volátiles (A.G.V.). El potencial eléctrico (Eh) y el pH estuvieron correlacionados ( $r^2 = -0.9939$ ), y sus valores finales fueron 154 mv y 4.48, respectivamente. A las 12 h de cultivo se observó la concentración máxima de diacetilo, 779.56 mg/Kg y su cinética de producción se correlacionó al crecimiento de las bacterias lácticas ( $r^2 = 0.9972$ ). La velocidad específica de crecimiento,  $\mu = 0.47$  1/h, fue considerada como normal para las bacterias lácticas, y la productividad de diacetilo fue de  $47.6 \mu\text{g}_{\text{Día}} / (\text{g}_{\text{medio}} \cdot \text{h})$ . En ese período, los contenidos de A.G.V. y de ácido láctico se consideraron bajos (1 312 mg/Kg y 0.67 g/Kg, respectivamente). Después, la cuenta viable y el contenido de diacetilo disminuyeron y los A.G.V. y el ácido láctico aumentaron; por lo que el mejor período de fermentación fue de 12 h.

Para determinar *in vitro* la actividad amilolítica de extractos preparados con diferentes fracciones celulares se realizaron cultivos sumergidos axénicos en medio de almidón utilizando las condiciones de cultivo previamente seleccionadas. Las actividades amilolíticas ligadas a la pared celular de *Pd. pentosaceus* y de *Lb. acidophilus* fueron de 47.32 y 6.16 U/l, respectivamente. *Lb. acidophilus* consumió almidón, 1.32 g/l, y mostró una actividad amilolítica extracelular de 4,187.3 U/l, pero no produjo diacetilo. *Pd. pentosaceus* consumió almidón, 2.38 g/l y produjo diacetilo, 39.84 g/l. No hay antecedentes de producción de amilasas por *Pd. pentosaceus*, y su producción de diacetilo supera por más de 35 veces las de los productos lácteos fermentados.

## ABSTRACT

The main purpose of this work was to determine the significant conditions of cultivation that enhanced the production of diacetyl in a mixed culture of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* Hansen 1748, when grown in a corn-based semisolid medium. Taking into account that diacetyl is the main component in the complex butter aroma, the obtained product might be useful in the development of aromatic extensors for the food industry.

Series of submerged cultures in starch-based media were carried out with this purpose, as fermentation model systems. These series were structured as factorial orthogonal arrangements: L16, L8 and L8, respectively, according to the methodology of Taguchi. The effect of several culture conditions were evaluated with the changes of starch and diacetyl concentrations, and the extracellular amylase activity, after 5 days of cultivation. In the axenic cultures of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> series, *Pd. pentosaceus* produced more diacetyl (63.27 mg/l) with added glucose, yeast extract and CaCO<sub>3</sub>, at 28°C, but it consumed more starch (18.4 g/l) in the absence of glucose. *Lb. acidophilus* wasn't able to produced diacetyl, but it consumed more starch (26.56 g/l) at 28°C with CaCO<sub>3</sub>, glucose and yeast extract; however, the extracellular amyolytic activity (10 077 U/l) was favoured at 35°C. Though little starch was consumed in

mixed cultures of the 3<sup>rd</sup> series due to the low pH, diacetyl content was increased to 135.76 mg/l, at 32°C.

Later on, two series of mixed cultures were carried out in semisolid corn-based media (humidity: 78%,  $a_w \geq 0.995$ ), using L8 Taguchi factorial designs, and applying the previously selected conditions. In the 1<sup>st</sup> series, the effect of different corn pre-treatment conditions were evaluated upon the production of diacetyl, butyric acid and lactic acid by *Pd. pentosaceus* and *Lb. acidophilus*, when they were cultured during 5 days at 32°C. Selected pre-treatment conditions were: boiling of grains in lime-water for 20 min; the grain was milled and sieved to a particle size was below 0.42 mm (mesh 40); defatting with hexane, and cooking during 25 min. In the 2<sup>nd</sup> series, some cultural conditions were evaluated upon the production of diacetyl. Chosen conditions were: the addition of yeast extract and inoculation with *Pd. pentosaceus* and *Lb. acidophilus* in a 3:1 ratio. These conditions produced 311.6 mg/Kg of diacetyl, 359 mg/Kg of butyric acid and 2.28 g/Kg of lactic acid. The amylolytic activity was not evaluated in these corn-based complex systems, though starch was consumed (54.8 g/Kg).

Another corn-based culture was carried out in with selected conditions in order to determine the kinetic parameters of the culture. The inoculated lactic acid bacteria prevailed throughout the culture (120 h), but since the media were not sterilized, native *Bacillus* spp. and strains of *Enterobacteriaceae* were also observed. They could contribute to the consumption of starch and the production of volatile fatty acids (V.F.A.). The electric potential (Eh) and pH were highly correlated ( $r^2 = -0.9939$ ), and

their final values were 154 mv and 4.48, respectively. The maximum diacetyl concentration was observed after 12 h of culture, 779.56 mg/Kg, and the kinetics of production correlated to kinetics of growth ( $r^2 = 0.9972$ ). The specific growth rate,  $\mu = 0.47$  1/h, was common for lactic acid bacteria, and the productivity for diacetyl was  $47.6 \mu\text{g}_{\text{Dia}} / (\text{g}_{\text{medium}} \cdot \text{h})$ . During that period, the V.F.A. and lactic acid contents were considered low (1 312 mg/Kg and 0.67 g/Kg, respectively). Thereafter, the cell growth and the production of diacetyl decreased while A.G.V. and lactic acid increased; therefore, the best period of fermentation was 12 h.

In order to determine *in vitro* the amylolytic activities of the extracts prepared from different fractions of the cells, axenic submerged cultures of both strains were carried out in starch medium. The conditions of cultivation previously selected were used. The cell wall-linked amylolytic activities of *Pd. pentosaceus* and *Lb. acidophilus* were 47.32 and 6.16 U/l, respectively. *Lb. acidophilus* consumed starch, 1.32 g/l, and showed an extracellular amylolytic activity of 4,187.3 U/l, but it was unable to produce diacetyl. *Pd. pentosaceus* consumed starch, 2.38 g/l and produced diacetyl, 39.84 mg/l. The production of amylases is unusual in *Pd. pentosaceus*, and its production of diacetyl surpassed over 35 folds those present in dairy fermented products.

## ÍNDICE

| No.         | CAPÍTULO  | PÁGINA |
|-------------|---|--------|
|             | <b>JURADO</b>                                       | 5      |
|             | <b>RESÚMENES</b>                                    |        |
|             | Resumen corto en español                            | 7      |
|             | Resumen corto en inglés (Abstract 1)                | 9      |
|             | Resumen largo en español                            | 11     |
|             | Resumen largo en inglés (Abstract 2)                | 15     |
|             | <b>INTRODUCCIÓN</b>                                 | 21     |
| <b>I.</b>   | <b>GENERALIDADES</b>                                | 27     |
|             | Formación de diacetilo por las bacterias lácticas   | 29     |
|             | Actividad amilolítica de las bacterias lácticas     | 37     |
|             |   | 31     |
| <b>II.</b>  | <b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>                 | 39     |
|             | Antecedentes  | 41     |
|             | Justificación                                       | 44     |
| <b>III.</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                    | 51     |
|             | Objetivo general                                    | 53     |
|             | Objetivos específicos                               | 53     |
| <b>IV.</b>  | <b>HIPÓTESIS</b>                                    | 55     |
| <b>V.</b>   | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>                         | 59     |
|             | Cepas   | 61     |
|             | Medios de cultivo                                   | 63     |
|             | Diseños experimentales y análisis estadísticos      | 68     |
|             | Conservación de cepas                               | 80     |
|             | Condiciones de cultivo en las series factoriales    | 84     |
|             | Preparación de muestras                             | 87     |
|             | Métodos de análisis microbiológicos                 | 89     |
|             | Métodos de análisis físicos, químicos y enzimáticos | 90     |

| No.        | CAPÍTULO  | PÁGINA |
|------------|---|--------|
| <b>V.</b>  | <b>MATERIALES Y MÉTODOS (Continuación)</b>  |        |
|            | Cinética de cultivo mixto en medio de maíz  | 98     |
|            | Cultivos para determinar las actividades y localización de las amilasas en las células  | 100    |
| <b>VI.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 105    |
|            | Cultivos en medios a base de almidón  | 107    |
|            | Determinación de las condiciones de cultivo en medios semisólidos a base de maíz  | 172    |
|            | Cinética de fermentación en un cultivo mixto a base de maíz con <i>Pediococcus pentosaceus</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 214    |
|            | Localización de las amilasas en las células y determinación de sus actividades  | 216    |
|            | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>   | 247    |
|            | Conclusiones  | 249    |
|            | Recomendaciones   | 255    |
|            | <b>ANEXOS</b>   | 257    |
| <b>1</b>   | Fundamentos del diseño experimental   | 259    |
| <b>2</b>   | Preparación de soluciones   | 263    |
| <b>3</b>   | Elaboración de curvas de crecimiento de <i>Pd. pentosaceus</i> y de <i>Lb. acidophilus</i> en cultivos sumergidos de glucosa      | 269    |
| <b>4</b>   | Artículos publicados  | 275    |
|            | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | 317    |

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Las sustancias aromatizantes son compuestos intermediarios empleados ampliamente en la industria de los alimentos. Estos aditivos pueden ser producidos por síntesis química o por procesos biotecnológicos.

El diacetilo es uno de los componentes primordiales del aroma característico a mantequilla, aunque también están presentes otros compuestos volátiles con menor poder aromatizante. Algunos de los compuestos son: el acetaldehído, la acetona, la 2-butanona, la lactona, los ácidos grasos volátiles de cadena corta (A.G.V.) como el acético, el propiónico y el butírico y sus ésteres (Cachon y Diviès, 1993; Escamilla *et al.*, 1996b; Furia y Bellanca, 1975).

El diacetilo, así como los compuestos de acompañamiento son producidos por determinadas especies de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*. La biosíntesis de este compuesto en los productos lácteos y en los vinos depende de la presencia de citrato, que es metabolizado por las bacterias lácticas a través de diversas rutas metabólicas, la más frecuente es la del metabolismo del piruvato (Cogan, 1995; Cogan *et al.*, 1996; Escamilla *et al.*, 1996a; Marshall, 1987). Otras rutas alternativas que se han determinado son a partir de la glucosa o del acetaldehído, en las cuales no interviene el citrato (Cogan *et al.*, 1989; Escamilla *et al.*, 1996a).

La producción del diacetilo por las bacterias lácticas se ha estudiado principalmente en los productos lácteos (Klaver *et al.*, 1992; Marshall, 1987), y en menor proporción, en bebidas alcohólicas (Shimazu *et al.*, 1985) y algunos vegetales (Margalith, 1981).

A la fecha se han realizado algunos avances en los procesos biotecnológicos de producción de diacetilo, como son: el desarrollo de cepas lácticas mejoradas de los géneros *Lactococcus* spp. o *Leuconostoc* spp.; el desarrollo de procesos fermentativos en medios a base de leche, que pueden llegar a producir hasta 12 - 18 mg/l de diacetilo (Klaver *et al.*, 1992); procesos enzimáticos para la conversión de acetoína en diacetilo, y métodos de extracción de éste último después de los procesos biotecnológicos (Pszczola, 1994; SANOFI Bio-Industries, 1994). Sin embargo, aún es necesario avanzar en el conocimiento de estos procesos a fin de adquirir el control completo de la producción de diacetilo y de los compuestos de acompañamiento en el aroma a mantequilla. Los extractos y materiales aromatizados obtenidos por estos procesos biotecnológicos imparten un aroma complejo, que es reconocido como 'natural', por lo que tiende a substituir cada vez más a las formulaciones aromáticas artificiales (Marshall, 1993; Pszczola, 1994; Sanders *et al.*, 1993).

En los alimentos procesados, las concentraciones de adición recomendadas de diacetilo son, en mg/l o mg/Kg: bebidas no alcohólicas, 2.5; helados y nieves, 5.9; dulces, 21; productos horneados, 44; gelatinas y pudines, 19 y chicles, 35 (Escamilla *et al.*, 1995b; Furia y Bellaca, 1975).

Cuando se plantea la utilización de sustratos que sustituyen la leche en las fermentaciones lácticas, los criterios de selección principales son: la selección de cepas con capacidades enzimáticas apropiadas a la nueva composición; la disponibilidad de las materias primas alternativas; la determinación de las condiciones de producción; la calidad sanitaria y sensorial de los productos, y sobre todo, la factibilidad económica de los procesos desarrollados.

El interés principal de este trabajo fue determinar las condiciones de un cultivo mixto de *Pediococcus pentosaceus* y de *Lactobacillus acidophilus* en un medio a base de maíz, para obtener mayores niveles de los compuestos aromatizantes característicos del aroma tipo mantequilla que los reportados previamente, destacando al diacetilo.



## **I. GENERALIDADES**



## I. GENERALIDADES

### FORMACIÓN DE DIACETILO POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

#### BIOSÍTESIS DEL DIACETILO.

Se ha determinado que *Lactococcus lactis* sp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Le. lactis* y otras bacterias lácticas, producen diacetilo al consumir simultáneamente citrato y lactosa (o glucosa), debido a que forman un exceso de piruvato que no se destina a la recuperación de  $\text{NAD}^+$ , sino que se transforma en parte en diacetilo a través de la ruta de descarboxilación oxidativa del  $\alpha$ -acetolactato, con gasto de tiamin-pirofosfato (TPP). Una ruta alternativa es la que parte del acetaldehído, por la vía de la acetoína y del acetil-CoA, sin pasar por  $\alpha$ -acetolactato. La presencia de citrato en estos cultivos estimula el consumo del carbohidrato y la velocidad de crecimiento (Cogan 1995; Escamilla *et al.* 1996a; Margalith 1981; Marshall 1987).

Durante la fermentación maloláctica de los vinos con *Le. mesenteroides* sp. *lactosum* también se produce diacetilo a expensas del consumo de citrato (Wibowo *et al.* 1985). En este sistema, la enzima citrato liasa transforma al citrato en

oxaloacetato, luego se forman piruvato y  $\alpha$ -acetolactato hasta llegar al diacetilo, con gasto de TPP (Shimazu *et al.*, 1985).

La Fig. 1 resume las rutas metabólicas conocidas en la actualidad para la producción de diacetilo por las bacterias lácticas (Escamilla *et al.*, 1996a). Existen indicios de que la ruta del citrato no es la única que da origen al diacetilo, pues *Pediococcus cerevisiae* es capaz de formar este metabolito sin consumir ácido cítrico en el vino (Wibowo *et al.*, 1985).

#### DEGRADACIÓN DEL DIACETILO.

En diversos alimentos se ha observado una etapa de incremento en la concentración de diacetilo, que dura de 12 a 24 h, para luego disminuir, aún cuando el crecimiento microbiano continúe. Esto se ha observado en la leche (Margalith, 1981), en el ghee, alimento hindú de grasa de leche (Yadav y Srinivasan, 1985) y en el Dhokla (Joshi *et al.*, 1989); pero en fermentaciones de masa de maíz (Escamilla *et al.*, 1992) y en la col agria (Margalith, 1981), la formación de diacetilo se prolongó durante varios días.

La degradación del diacetilo se presenta cuando el pH es menor de 5.2, porque se activan las enzimas diacetil reductasa y acetoín reductasa de las bacterias lácticas, transformando el diacetilo en acetoína, y éste en 2,3-butanodiol (Cogan *et al.*, 1989; Margalith, 1981; Marshall, 1987).

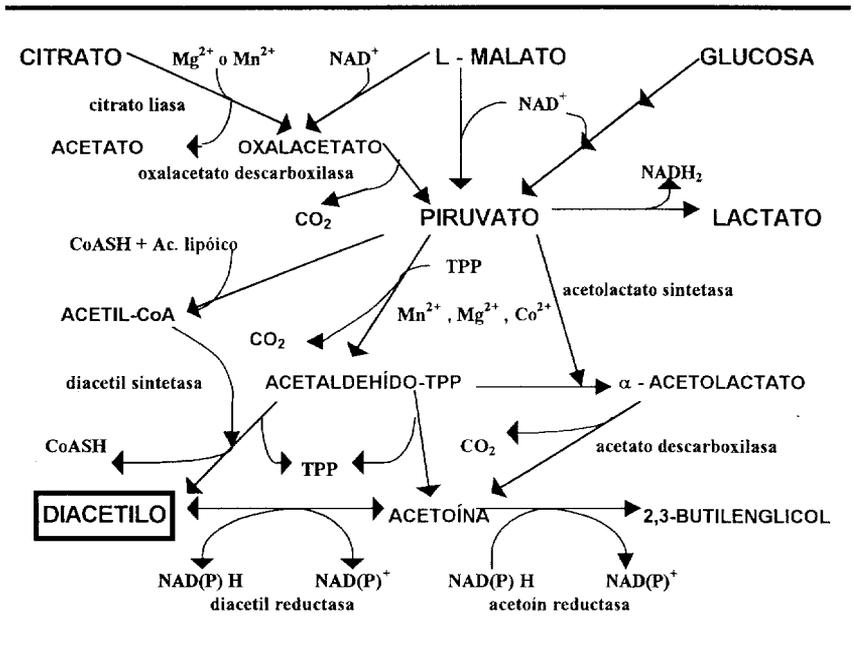


Fig. 1. Rutas metabólicas de producción de diacetilo en las bacterias lácticas (Cogan, 1995; Kempler, 1983; Margalith, 1981, Marshall, 1987; Shimazu, 1985)

Algunas moléculas energéticas y compuestos intermediarios derivados del metabolismo de la glucosa en presencia de citrato por *Le. lactis* inhiben la actividad de  $\alpha$ -acetolactato sintetasa a pH neutro, ese efecto disminuye conforme el pH baja de 5.4. El ATP tiene un efecto distinto, pues la inhibición que causa a esa enzima se acentúa a pH bajo (Cogan *et al.*, 1984).

## INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CULTIVO EN LA BIOSÍNTESIS DEL DIACETILO.

Los factores mas importantes que influyen en la producción del diacetilo por las bacterias lácticas son:

CEPAS. *Le. cremoris* (antes *Le. citrovorum*) y *Lact. lactis* sp. *lactis* biovar. *diacetilactis* (antes *Streptococcus diacetylactis*) son las bacterias lácticas que forman los niveles más altos de diacetilo (0.5 y 20 mg/l) en los productos lácteos (Margalith 1981; Marshall, 1987; Yadav y Srinivasan, 1985). Otras especies importantes son: *Lb. delbreuckii* sp. *bulgaricus* (antes *Lb. bulgaricus*), *Lb. helveticus*, *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* (antes *St. thermophilus*) y algunas cepas de *Lact. lactis* sp. *cremoris* (Cogan 1995; Escamilla *et al.* 1996a; Klaver *et al.* 1992; Margalith, 1981; Marshall 1987 y 1993; Tamime y Deeth, 1980).

Las cepas que forman diacetilo como producto secundario durante la fermentación maloláctica en los vinos son: *Le. oenos*, *Le. mesenteroides*, *Le.*

*cremoris*, *Le. dextranicum*, *Pd. cerevisiae*, *Pd. pentosaceus*, *Lb. buchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermenti*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. brevis* y *Lb. hilgardii* (Davis et al. 1985, Klaver et al. 1992).

La concentración elevada de inóculo favorece la producción de diacetilo debido a que la actividad de la diacetil reductasa se contrarresta; este comportamiento se observó en el ghee con un 3 % de inóculo (Yadav y Srinivasan, 1985) y en la leche inoculada con un iniciador de alta concentración de células, en donde se produjo diacetilo de 8 - 8.4 mg/Kg en solo 2 h de cultivo. En cultivos lácticos mixtos, la presencia de cepas de acidificación rápida favoreció también la producción de diacetilo por *Le. cremoris* (Margalith, 1981).

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SUBSTRATO.** El contenido de citrato determina el rendimiento de diacetilo producido en la leche o en el vino. En el primer alimento se recomienda suplementar el ácido para incrementar hasta un 300 % la producción de diacetilo (Bottazzi y Vescovo 1969, Harvey y Collins 1963, Margalith, 1981). En los vinos tintos por otro lado, se prefieren concentraciones < 50 µg de diacetilo, pues su nota aromática elevada se considera síntoma del deterioro llamado 'picadura láctica'; por esa razón se recomienda usar uvas con baja concentración de citrato, o aplicar cepas malolácticas durante la maduración que sean poco activas en la producción de diacetilo (Kunkee, 1967).

El metabolismo simultáneo de citrato y glucosa estimula el crecimiento de cepas de *Le. spp.*, favorece el consumo de glucosa, la producción de lactato y la de

metabolitos secundarios (Cogan, 1995). *Lc. lactis* en cultivo por lotes con exceso de glucosa produce sólo lactato, pero en un quimiostato glucosa-limitante con aereación moderada, produjo también acetoina + diacetilo (Cogan et al, 1995).

La presencia de CO<sub>2</sub> (10%) en la atmósfera de cultivos agitados de leche inoculada con poco inóculo (0.1 %, v/v) de *St. salivarius* sp. *thermophilus* estimuló el crecimiento microbiano, debido a su efecto como regulador de pH y redox, además de formar aromas al favorecer el metabolismo del piruvato. El mismo efecto lo dieron el NaHCO<sub>3</sub> (50 - 60 mM), o el ácido oléico y sus ésteres como el Tween 80 y 85, en niveles de 0.1%. Pero en cultivos con mayores niveles de inoculación (1%) no se observó ese efecto (Louaileche et al., 1993).

La deficiencia del cofactor ácido lipóico (ácido tiótico o ácido DL-1,2-ditiolan-3 pentanóico) inhibe la formación de ácido acético en la ruta de  $\alpha$ -acetolactato y favorece la acumulación de diacetilo (Cogan et al. 1989, Kaneko et al., 1990); pero en la vía del acetaldehído y del acetil-CoA se requieren pequeñas cantidades de los ácidos acético y lipóico para formar diacetilo (Margalith, 1981).

Los iones Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> favorecen la producción de diacetilo y acetoina vía citrato por *Le. mesenteroides* sp. *lactosum*, en tanto que los iones Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Sn<sup>2+</sup> y los compuestos orgánicos L-cistina y acetaldehído, la inhibe. *Lc. lactis* sp. *lactis* formó diacetilo en caldo M.R.S. sin citrato y con aereación, cuando se adicionaron iones Cu<sup>2+</sup> o hemina (Kaneko et al., 1990).

*POTENCIAL REDOX Y O<sub>2</sub>*. Estos parámetros han sido poco estudiados en los cultivos destinados a la producción de diacetilo. Para incrementar el aroma de la leche-mantequilla se recomienda realizar un cultivo aerobio, además de saturar el producto con aire antes de almacenarlo (Klaver *et al.*, 1992, Margalith, 1981). La influencia de la aireación en la formación de diacetilo se explica por el efecto positivo de la elevación de redox, debido a que la actividad de la  $\alpha$ -acetolactato sintetasa se incrementa de 2 a 2.5 veces en cultivos aereados (Cogan *et al.*, 1989). Por otra parte, con aireación moderada (1 vvm con 25% de aire) se inhibe la enzima piruvato - formato liasa, favoreciendo la biosíntesis del diacetilo y de la acetoína, sin afectar el crecimiento microbiano (Cogan *et al.*, 1989).

Se ha observado que el contenido de diacetilo disminuye durante la maduración prolongada del queso cheddar, ya que la degradación de la proteína libera compuestos sulfurados que bajan el potencial redox hasta un valor de  $E_h = -200$  mV (Green y Manning, 1982). En un medio reducido la  $\alpha$ -acetolactato sintetasa se inhibe y se activa la diacetil-reductasa, como se indicó previamente.

*pH*. El rango de pH óptimo para la producción de diacetilo depende de las cepas utilizadas; por ejemplo, para *Leuconostoc* spp. es de 3.8 - 4.4 (Margalith, 1981), mientras que para *Lac. lactis* sp. *lactis* biovar. *diacetilactis* es de 5.2 – 5.4 (Keenan *et al.*, 1966; Klaver *et al.*, 1992). Estos valores tienen su origen en los óptimos de las principales enzimas involucradas que son: 6.0, 5.5, 5.7 y 5.7, para la citrato liasa,

acetolactato sintetasa, diacetil reductasa y acetoina reductasa, respectivamente (Mellerick y Cogan, 1981).

El rango de pH que origina la mayor producción de diacetilo durante la fermentación maloláctica del vino con *Le. mesenteroides* es de 3.5 - 3.8 (Cox y Henick, 1990), a pesar de que la enzima citrato liasa sea más activa a un pH de 6.0 (Shimazu *et al.*, 1985).

**TEMPERATURA.** Aunque la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas mesófilas esté alrededor de los 30°C, la de producción de diacetilo se ha observado entre 18 - 24°C (Margalith, 1981; Yadav y Srinivasa, 1985). Las bacterias termófilas como *St. salivarius* sp. *thermophilus* y *Lb. delbreuckii* sp. *bulgaricus* producen apreciables cantidades a 40 - 42°C (Green y Manning, 1982; McGregor y White 1987; Tamime y Deeth, 1980).

**ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ ).** Al reducir artificialmente el  $a_w$  de la leche de 0.98 a 0.87 se determinó que tanto la membrana citoplásmica de *Lc. lactis* sp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, como los sistemas de producción de energía se afectaban, disminuyendo su velocidad de crecimiento y sus mecanismos de formación de aromas (Bassit *et al.* 1993). Las bacterias malolácticas como *Le. mesenteroides* sp. *lactosum* (antes *Le. oenos*) (Davis *et al.* 1985; Mangas *et al.*; 1993; Wibowo *et al.*, 1985) y las de la salsa de soya, como *Pd. halophilus* (Kanbe y Uchida, 1987) están mejor adaptadas a niveles bajos de  $a_w$ , por lo que presentan una elevada actividad aún en valores muy reducidos de ese parámetro.

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN.

En el Anexo 4 se presenta copia de dos artículos de revisión bibliográfica sobre el tema de producción de diacetilo y su relación con los aromas en los alimentos fermentados, los cuales fueron elaborados por la estudiante de doctorado y por los integrantes del Comité Tutorial. En ellos se amplía la información relacionada con los antecedentes generales de este trabajo. Las referencias son las siguientes:

- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosio, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J. 1996a. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38 (2): 129-137.
- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosio, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J. 1996b. Importancia del diacetilo en los aromas producidos por fermentación láctica. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*. 31 (2): 16-22.

## ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Existe un número limitado de cepas de bacterias lácticas capaces de hidrolizar almidón. La mayor parte de las amilasas producidas por estas bacterias son extracelulares, pero algunas están ligadas a la célula. Las actividades amilolíticas observadas son muy variables, 0-17 – 240 000 U/l (*Champ et al.*, 1983; *Giraud et al.*, 1993; *Imam et al.*, 1991; *Olympia et al.*, 1995; *Sen y Chakrabarty*, 1984), pero normalmente son inferiores a las de los mohos, las levaduras o bacterias de la familia

*Bacillaceae*. Sen y Chakrabarty (1984) determinaron la actividad de la  $\alpha$ -amilasa extracelular producida por *Lb. cellobiosus*. Li y Chan (1983) observaron una actividad inducible de la  $\alpha$ -glucosidasa intracelular de *Lb. acidophilus*. La  $\alpha$ -amilasa extracelular de *Lb. plantarum* fue caracterizada por Giraud *et al.* (1993, 1994) y la glucoamilasa de *Lb. amylovorus* por Imam (1991), por Olympia *et al.* (1995) y por James *et al.* (1997). Estas enzimas son constitutivas, pero su actividad puede incrementarse con inductores, como la maltosa. *Streptococcus bobis*, *Pediococcus damnosus* y algunas otras bacterias lácticas también han mostrado actividad amilolítica (Champ *et al.*; 1983; Garvie 1986; Kandler y Weiss 1986). Pero no se ha encontrado evidencia de la capacidad de cepas de formar diacetilo. Sin embargo, cepas de *Pd. pentosaceus* han sido aisladas de maíz ensilado, demostrando su capacidad de utilización de ese sustrato para su desarrollo (Coccocelli *et al.*, 1991).

## **II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**



## II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### ANTECEDENTES

#### PRODUCCIÓN DE DIACETILO EN SUBSTRATOS AMILÁCEOS.

La producción de compuestos aromatizantes formados durante la fermentación láctica de substratos amiláceos ha sido estudiada por Joshi *et al.* (1989). Ellos detectaron un aroma tipo mantequilla en el Dhokla, un alimento hindú elaborado con cereales y leche, por lo que cuantificaron los contenidos de diacetilo (5.2 mg/Kg) y de los A.G.V. En los productos de panificación, el contenido normal de diacetilo es de 44 – 62.5 mg/Kg, aunque parte de este compuesto es producido por la levadura (Margalith, 1981).

Han habido algunos intentos previos para inducir la formación de aroma a mantequilla por fermentación láctica en alimentos no convencionales de tipo amiláceo. Hofmann y Marshall (1985) produjeron ese aroma en un queso crema parcialmente substituido con soya, y fermentado con *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*. Sin embargo, Nsofor y Chukwo (1992) no tuvieron éxito al fermentar yoghurt de soya adicionada con citrato de sodio, inoculando con *Lb. bulgaricus* y *St. thermophilus*.

Nsofor *et al.* (1992) indujeron un aroma tipo lácteo con alta aceptabilidad sensorial al fermentar maíz con una flora láctica heterogénea, pero el aroma característico del diacetilo estuvo ausente.

Escamilla y Mozqueda (1992) realizaron estudios microbiológicos y bioquímicos relacionados con la fermentación que se establece naturalmente en algunos alimentos tradicionales fermentados de maíz. Estos alimentos son preparados y consumidos por diversas etnias en México. Se estudió la fermentación láctica del pozol, que es una masa fermentada de maíz nixtamalizado, y también la del atole de maíz agrio (Escamilla *et al.*, 1993). En ambos procesos fermentativos se detectaron compuestos aromatizantes tipo lácteo, encontrando un predominio aromático del ácido butírico y del diacetilo (Olguín *et al.*, 1988). Diversas cepas de los géneros: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp. aisladas de esos alimentos fueron capaces de formar diacetilo y acetoina (Verde *et al.*, 1995). Escamilla y Olguín (1997) patentaron un proceso de elaboración de un alimento fermentado de maíz con agradable aroma tipo lácteo, cuyo producto, también patentado, contiene entre otros volátiles, diacetilo y A.G.V., como los ácidos acético, propiónico y butírico. Durante el desarrollo de este proceso se compararon varias alternativas de las condiciones del proceso. Se realizó un estudio tecnológico comparativo, seleccionando la mejor alternativa. Se caracterizó el producto con análisis bromatológicos, cromatográficos, de microbiología sanitaria y sensoriales. Se llevó a cabo un estudio preliminar de mercado con distribución de muestras del alimento seleccionado en el Estado de Tabasco, el cual tuvo buena aceptabilidad. El estudio de prefactibilidad que se realizó (sin inversionista), propuso una capacidad de

la planta de 2 Tons/día. Considerando un proyecto de 5 años iniciando en 1991, el valor presente neto (VPN) fue de  $1.2 \times 10^5$  U.S.D. y la tasa interna de retorno resultó de (TIR) 31.2%, con lo que se concluyó que el proyecto era presumiblemente viable, en el nivel de estudio, que era preliminar. Se observó también que la fermentación sólida de más de 3 días en condiciones de fermentación no optimizadas, frecuentemente incrementaba la producción de ácido butírico a un nivel que impartía a la masa una nota aromática nauseabunda (Escamilla *et al.*, 1992).

#### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS UTILIZADAS.

Se aislaron en medios selectivos aproximadamente 60 cepas de bacterias lácticas de diversos alimentos; ya sea de tipo amiláceo (Escamilla y Mozqueda, 1992; Escamilla *et al.*, 1993), o bebidas alcohólicas (Verde *et al.*, 1995).

Las cepas aisladas y otras de la colección ATCC se sometieron a un proceso de selección para obtener una cepa de la familia *Streptococcaceae* y una de *Lactobacillaceae* que produjeran diacetilo y/o hidrolizaran almidón. La actividad amilolítica se determinó cualitativamente por acidificación de caldos, con almidón como única fuente de carbono, y por desarrollo de halos de hidrólisis en placas de agar almidón. La producción de diacetilo + acetoína se detectó cualitativamente con la reacción de Voges – Proskauer en caldos con medio MRVP (rojo de metilo - Voges Proskauer).

De las cepas nativas se seleccionó la que produjo más diacetilo. Esta cepa se caracterizó fenotípicamente, determinando que pertenecía a la especie de

*Pediococcus pentosaceus* y además que podía hidrolizar ligeramente al almidón (Verde *et al.*, 1995). El Manual de Bergey's indica que ninguna especie del género *Pediococcus* es patógena para las plantas o los animales (Garvie, 1986).

De la familia *Lactobacillaceae* se seleccionó a *Lactobacillus acidophilus* 1748 de la colección ATCC por haber formado el mayor halo de hidrólisis en placas de almidón entre las 100 cepas evaluadas. Esta cepa no produjo diacetilo (Verde *et al.*, 1995). Además, esta cepa tiene propiedades probióticas, pues es capaz de establecerse en el tracto gastrointestinal para formar parte de la flora microbiana deseable (Nahaisi, 1986).

Resumiendo, se utilizó *Pd. pentosaceus* amilasa (+) y diacetilo (+), y *Lb. acidophilus* amilasa (+) y diacetilo (-).

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay una demanda importante de alimentos procesados con aromas reconocidos como 'naturales' (Dziezak, 1986); entre ellos, los que tienen una nota a mantequilla han provocado un gran interés. El aroma puede formarse durante las operaciones del proceso del alimento o puede incorporarse en alguna materia prima o ingrediente. Estos 'aromas de reacción' pueden formarse en un proceso microbiológico controlado, de cuyas reacciones resulta una gama muy grande de compuestos químicos, algunos de ellos en concentraciones traza. En contraste, la formulación con aromatizantes artificiales resulta costosa y por lo mismo, limitada a un pequeño número de compuestos (Lindsay 1966, Margalith 1981, Sandine *et al.*,

1972). La ventaja insustituible de los 'aromas de reacción' es que reproducen fielmente el sabor natural, cosa que no es posible con las formulaciones de sabores artificiales.

El compuesto que resalta en la nota aromática tipo mantequilla es sin duda el diacetilo, o 2,3-butanodiona ( $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$ ), pero se complementa con una mezcla compleja de otros metabolitos, como el acetaldehído, la acetoína, el acetaldehído, los ácidos grasos volátiles (A.G.V.), el 2,3-butanodiol, etc. (Cachon y Diviès, 1993).

El diacetilo llega a formar parte de la formulación de un alimento por distintas vías, pero en ningún caso debe sobrepasar una concentración final de 10 g/Kg (Smith, 1990). El diacetilo puede formarse directamente durante los procesos fermentativos en el yoghurt, la mantequilla, la leche-mantequilla, los quesos, el pan y el vino (Margalith, 1981; Marshall, 1993; Merseburger *et al.*, 1995; Tamime y Deeth, 1980; Vasavada y White, 1979), en niveles de 0.5 a 20 mg/Kg. Otra vía es la adición como parte de un aromatizante artificial, integrado por una mezcla de 6-25 sustancias sintéticas (Escamilla *et al.*, 1996b). También hay presentaciones en el mercados de aromatizantes obtenido por procesos biotecnológicos. Primero se realiza una fermentación de medios a base de leche con cepas modificadas, produciendo hasta 18 mg/l de diacetilo (Klaver *et al.*, 1992), después se aplican tratamientos enzimáticos y se separan los volátiles. Los extractos obtenidos se dosifican en los alimentos en una proporción de 1-3% (Escamilla *et al.*, 1996b; Pszczola, 1994; SANOFI, 1999). Otra posible vía de adición de diacetilo son los espesantes que sirven de vehículo para los aromas. En muchos procesos industriales de alimentos se permite la substitución parcial de las materias primas de

alto costo o de poca disponibilidad, como la leche, por extensores como el almidón o almidones modificados. El Codex Alimentarius (Smith, 1990) menciona las especificaciones y restricciones del uso de los espesantes en la división de aditivos alimentarios. Estos espesantes encapsulan a los aromas, protegiéndolos de pérdidas durante los procesos térmicos, además de incidir en la textura del producto alimenticio (Hippleheuser, 1995).

Diversos alimentos se benefician de los aromatizantes con nota a mantequilla, como son: postres, helados, bebidas enriquecidas atoles, leches fermentadas como el yoghurt y otros, quesos, productos de repostería, botanas, cereales de desayuno, etc. (Furia y Bellanca, 1975; Hippleheuser, 1995; Merory, 1968; Pszczola, 1994).

Los países altamente tecnificados son los que han desarrollado la tecnología involucrada en la producción de los aromatizantes con nota a mantequilla, controlando por lo tanto su comercialización (Escamilla *et al.*, 1996b). Anualmente México importa 2000 Tons de aromatizantes con notas tipo lácteo incluyendo al diacetilo, pues este compuesto no se produce en México (Escamilla *et al.*, 1996b, INEGI, 1986). La F.D.A.- GRAS regula en de los Estados Unidos de América el uso de este aditivo no tóxico con el No. 2370 de registro en F.E.M.A. (Furia y Bellanca, 1975), permitiendo su utilización en ciertos aromatizantes artificiales, como las notas tipo mantequilla, queso, caramelo, café, fresa y leche malteada, entre otros (Furia y Bellanca 1975, Merory 1968).

A la fecha se han caracterizado diversos cultivos productores de diacetilo con bacterias lácticas (*Lactococcus* spp. o *Leuconostoc* spp.) utilizando substratos lácteos (Cogan, 1995; Marshall, 1993). Se ha observado que el diacetilo se origina

principalmente del ácido cítrico, y que las rutas bioquímicas involucradas varían de especie a especie microbiana. Sin embargo, los cultivos con bacterias amilolíticas en medios sin ácido cítrico, no se han caracterizado para la producción de diacetilo. En estos casos, los carbohidratos son las posibles fuentes para la biosíntesis del diacetilo.

En este trabajo se ha seleccionado al maíz como sustrato alternativo a la leche. Se propone estudiar las condiciones de cultivo para producir una pasta aromatizada por fermentación, con nota tipo mantequilla. El maíz es el cereal de mayor producción en México (en 1998 se produjeron 18 476 miles de Tons. (INEGI, 1999), además de ser un ingrediente común en la industria alimentaria, ya sea como materia prima o como extensor. El maíz con germen es un sustrato complejo que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias lácticas amilolíticas (Adeyemi y Beckley, 1986; Mercier *et al.*, 1992). Se realizó la nixtamalización al maíz por ser un procedimiento que eleva el valor nutritivo de la materia prima (López y Segura-Huáregui, 1986), además de que hace más accesible el sustrato a los microorganismos inoculados.

Aunque la población nativa del maíz sometido a fermentación natural puede ser asaroza (Adegoke y Babalola, 1988; Akingbala *et al.*, 1987; Fields *et al.*, 1981, Wachter *et al.*, 1993), el contenido de bacterias potencialmente patógenas puede ser reducida por procesos de limpieza y calentamiento del maíz. También contribuye la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. En este trabajo no se determinó esta actividad en las cepas inoculadas, *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*, pero la disminución de las cuentas de las bacterias patógenas durante las fermentaciones

heterogéneas en maíz, se ha atribuido frecuentemente a la acción de las bacterias lácticas (Adegoke y Babalola, 1988; Escamilla y Olguin, 1997; Hounhouigan *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1995). Diversas cepas de *Lb. acidophilus* y de *Pd. pentosaceus* son capaces de producir varios antibióticos no prohibidos por la S.S.A. y con comprobada eficiencia contra microorganismos patógenos (Nahaisi, 1986; Strasser-de-Saad y Manca-de-Nadra, 1993).

Los efectos estimulantes del desarrollo mutuo (simbiosis) entre las especies de la familia *Lactobacillaceae* y la familia *Streptococcaceae* son ampliamente conocidos (Pederson, 1979). Se seleccionó un cultivo mixto de cada una de ellas en este trabajo por estos motivos. También se consideraron sus propiedades amilolíticas y/o de producción de diacetilo (Verde *et al.*, 1995) y el hecho de que sean inocuas (Garvie, 1986; Kandler y Weiss, 1986).

Se propone una presentación semisólida de la pasta porque es un medio con alta actividad de agua ( $a_w \geq 0.995$ ) que no inhibe la fermentación. Mercier *et al.* (1992) realizó un cultivo sumergido a base de maíz con una humedad aproximada de 95.5%, para determinar la cinética de producción de ácido láctico por la bacteria amilolítica *Lb. amylophilus*. Ellos indicaron que la falta de homogeneidad y la sedimentación del medio dificultaron los análisis e impidieron determinar los parámetros cinéticos buscados. El nivel de humedad utilizado en el presente trabajo (78%) es apropiado para que el producto no presente sinéresis (separación de sólidos y líquidos); este valor se seleccionó en ensayos previos. Además, un medio semisólido ahorra espacio durante el proceso y el almacenamiento en relación con

uno líquido, y en caso de destinar el producto a la deshidratación, la carga de agua a retirar también es menor.

Se prefiere una textura fina de la pasta de maíz para que no altere con partículas grandes la sensación gustativa de tipo táctil, cuando se integre en la formulación de otros alimentos.

Se seleccionó la herramienta estadística diseñada por Taguchi (Ross, 1989) porque permite aplicar tratamientos estadísticos capaces de estimar los efectos de los factores principales y de algunas de las interacciones en las variables de respuesta seleccionadas, con la ventaja de que se realiza un reducido número de experimentos. Las matrices diseñadas por Taguchi están estructuradas con sólo una parte de todas las posibles combinaciones de los factores, pero manteniendo un arreglo ortogonal (A.O.), es decir, equilibrado. El método es muy flexible, pues permite que el investigador proponga con cierta libertad el diseño experimental específico que resuelve las incógnitas del trabajo, siempre y cuando se sigan ciertas reglas de diseño y tratamiento estadístico. El A.O. seleccionado entre una gama de matrices depende del número de los factores y niveles que se deseen evaluar; éstos se proponen considerando la experiencia en el campo de investigación.

Con este método se pueden evaluar hasta un número igual de factores que de experimentos, menos uno. Esto es posible porque el A.O. permite que todos los grados de libertad del error sean intercambiados por los grados de libertad de los factores, además proporciona las combinaciones específicas de los experimentos apropiadas para esa aproximación. El nivel de resolución del A.O. propuesto va a depender entonces del grado de saturación de la matriz. Se pueden resolver todos

los efectos de los factores e interacciones cuando se tiene aproximadamente una saturación de  $\frac{1}{4}$  de la matriz con los factores. El otro extremo es la resolución de los efectos sólo de los factores sin interacciones, cuando la matriz está saturada. Generalmente se utilizan en este método matrices semisaturadas o saturadas.

Este método ha permitido desde 1959 una considerable reducción en el costo de los experimentos en el área de investigación y sobre todo, en las plantas industriales. Su aplicación es frecuente en las áreas de: Tecnología alimentaria, mecánica, química, ingeniería eléctrica, agricultura y biomedicina, entre otras. En el compendio Science Citation Index de 1998 se citan 60 referencias del método de Geinichi Taguchi y 11 de Phillip J. Ross en áreas biológicas. Sin embargo, el método no se ha utilizado ampliamente en el área de la Biotecnología, por lo que se considera novedosa su aplicación en este trabajo.

La pasta semisólida de maíz propuesta pretende ser una presentación alternativa y novedosa a las presentaciones de aromatizantes a mantequilla que ya se encuentran en el mercado. Este producto podría ser refrigerado y utilizado directamente para aprovechar la viabilidad de los microorganismos probióticos, o ser tratada posteriormente con procesos enzimáticos, de extracción de volátiles, de deshidratación o de extrusión. La caracterización de esta pasta y el desarrollo tecnológico serían los pasos naturales que seguirían a este trabajo.

### **III. OBJETIVOS**



### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL.

Incrementar la producción de diacetilo y producir un contenido aceptable de ácidos grasos volátiles (A.G.V.), en cultivos lácticos en medios a base de almidón y de maíz, determinando los principales efectos de los factores de cultivo. Además, contribuir al conocimiento de los principales parámetros cinéticos de esos cultivos, a fin de obtener una materia prima a base de maíz con aroma tipo mantequilla, de potencial interés para la industria alimentaria.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar el efecto de diversos factores ambientales y nutricionales en la producción de diacetilo y en la utilización de almidón en cultivos modelos, axénicos y mixtos de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus acidophilus*, desarrollándose en medios líquidos a base de almidón.

2. Seleccionar las condiciones de las operaciones de pretratamiento de maíz y las de un cultivo semisólido, para aumentar el rendimiento de diacetilo y formar niveles de A.G.V. apropiados para un aroma tipo mantequilla.
3. Caracterizar los parámetros cinéticos más importantes para la producción de diacetilo en un cultivo mixto en medio semisólido a base de maíz.
4. Localizar y cuantificar las actividades de las enzimas amilolíticas producidas por *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*.
5. Comprobar que la metodología estadística de Taguchi es una herramienta válida y apropiada para diseñar experimentos y analizar resultados de investigaciones en el área de la Biotecnología, donde no es frecuente utilizarla.

#### **IV. HIPÓTESIS**

#### **IV. HIPÓTESIS**

Es posible orientar la fermentación láctica de un medio semisólido de maíz para incrementar el contenido de diacetilo, formar niveles apropiados de ácidos grasos volátiles, y producir un perfil aromático tipo mantequilla, por medio de la selección de las condiciones de pretratamiento de maíz y de fermentación más apropiadas.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

La Fig. 2 muestra la secuencia de los experimentos realizados en este trabajo.

### CEPAS.

Se utilizaron dos cepas de bacterias lácticas: una de *Pediococcus pentosaceus* (MITJ-10), aislada de sidra mexicana y caracterizada fenotípicamente (Verde *et al.*, 1995), y una de *Lactobacillus acidophilus* No. 1748 de la colección CHR - Hansen. Ambas cepas son inocuas (Garvie, 1986; Kandler y Weiss, 1986)) y capaces de crecer en medio de almidón, pero sólo *Pd. pentosaceus* produce diacetilo en medios de glucosa o de almidón.

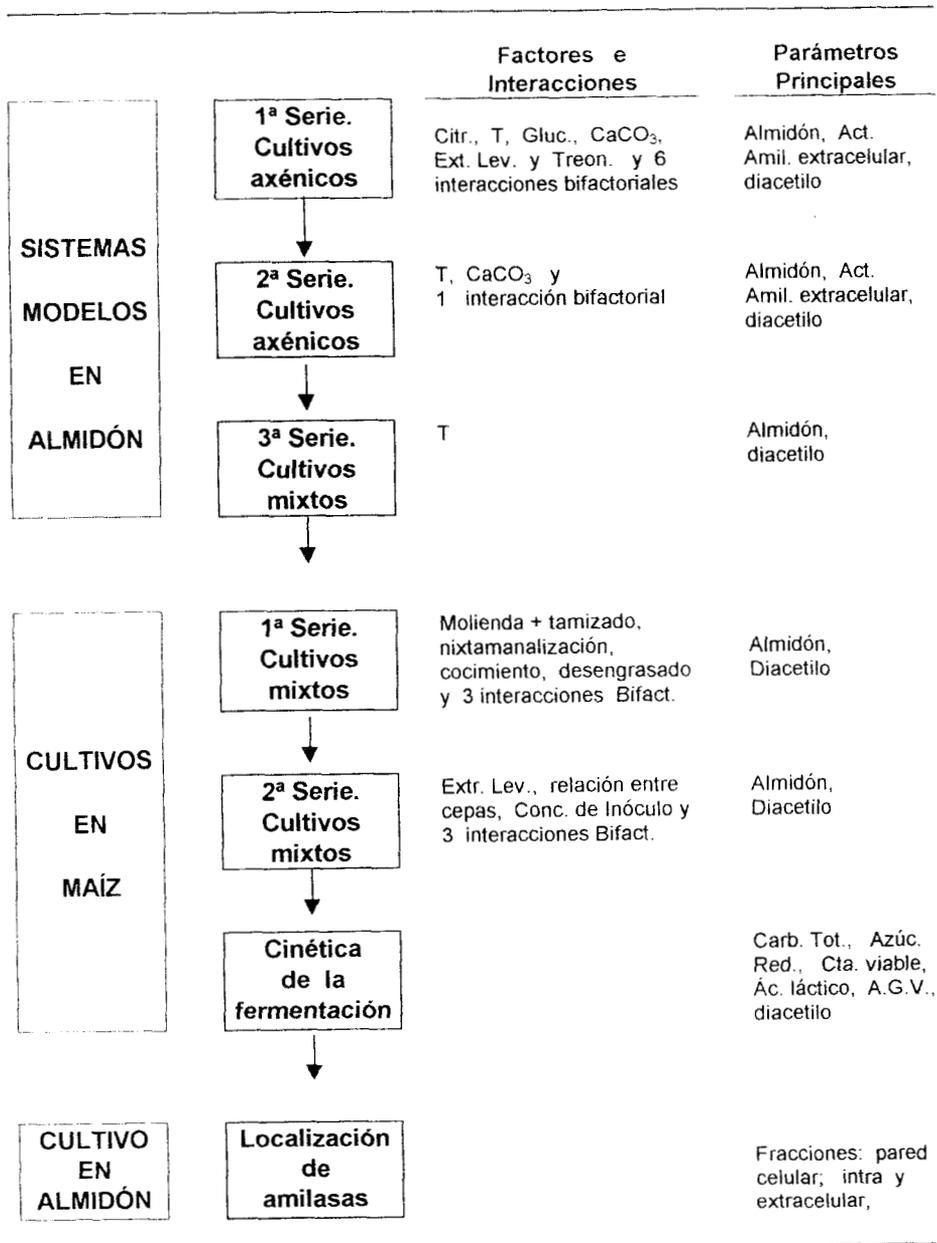


Fig. 2 Experimentos realizados en este trabajo

## MEDIOS DE CULTIVO.

### MEDIOS PARA CONSERVACIÓN Y PARA CUENTA VIABLE.

Se prepararon tubos con medio de agar micro/inóculo - almidón (MIA), con la siguiente composición en g/l de agua destilada: caldo de micro/inóculo (Merck), 18.5; almidón soluble, 5; agar, 15, y solución de vitaminas y minerales, 5 ml (Anexo 2). El medio fue preparado de acuerdo al procedimiento usual, ajustando el pH a 6.5 antes de esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. La esterilidad se verificó después de incubar a 35°C por 24 h. Este medio también se utilizó en las placas para cuenta viable de bacterias lácticas, aunque en ese caso, el medio fue adicionado con verde de bromocresol (50 mg/l), como indicador de acidez.

### MEDIO PARA LOS INÓCULOS.

*Medio de almidón.* Se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml, con 50 ml del caldo siguiente (g/l de H<sub>2</sub>O destilada): glucosa, 5; almidón soluble, 10; peptona de caseína, 2; extracto de levadura, 2; CaCO<sub>3</sub>, 0.3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0.1, y solución de vitaminas y minerales, 5 ml. El pH del medio se ajustó a 6.5. Los matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min y se realizó la prueba de esterilidad.

## MEDIO BASAL PARA LOS CULTIVOS EN ALMIDÓN EN LAS SERIES FACTORIALES.

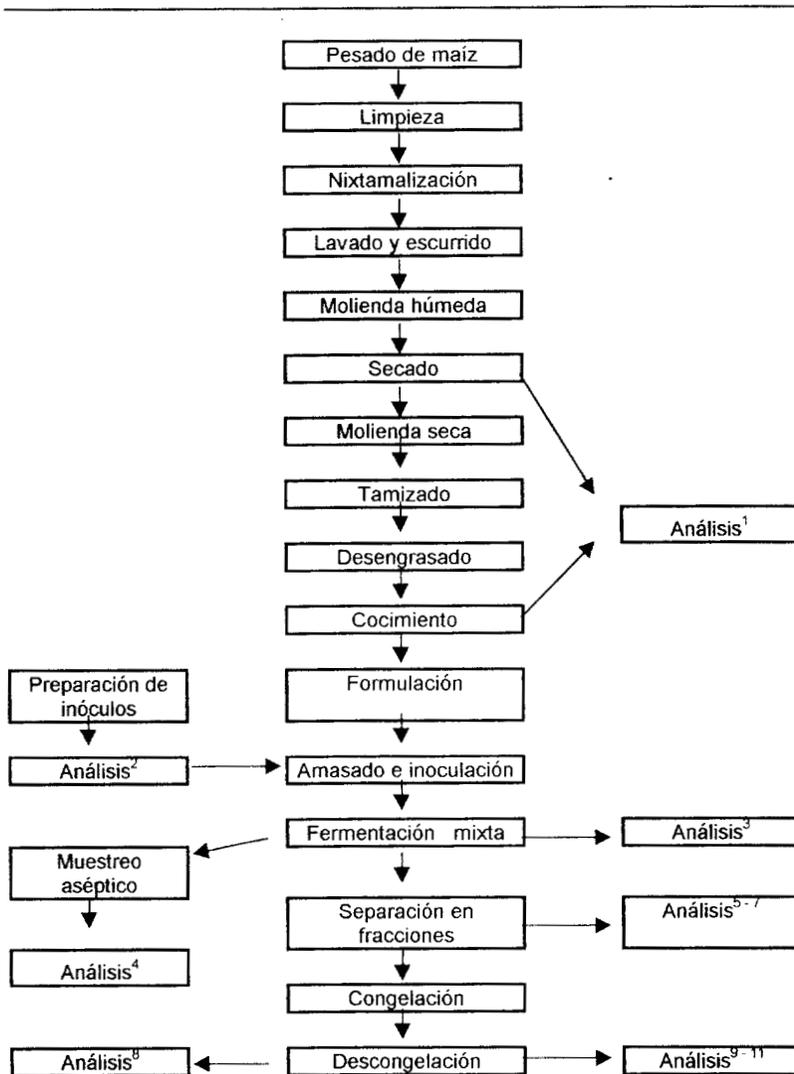
Los caldos de almidón tuvieron una composición semejante al medio de los inóculos. Las concentraciones de glucosa, almidón, extracto de levadura y  $\text{CaCO}_3$  se ajustaron de acuerdo al diseño experimental de cada serie, que se indican en el inciso correspondiente. En la 3ª serie de almidón, la concentración de almidón soluble fue de 5 g/l.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de cada medio, con pH de 6.5. Los medios se esterizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min y se les aplicó la prueba de esterilidad.

## MEDIO BASAL PARA LOS CULTIVOS EN MAÍZ.

Se prepararon masas de maíz nixtamalizado de consistencia semisólida (humedad: 78%) como medios de cultivo en las series factoriales de maíz. Se utilizó maíz blanco (*Zea mais*) tipo pozolero con germen. El maíz utilizados tuvo dimensiones aproximadas de 1.6 x 10.6 mm, se adquirió en la Central de Abastos de la Ciudad de México, D.F., con procedencia del Estado de México.

La cal utilizada en la nixtamalización,  $\text{Ca(OH)}_2$  era comercial, de grado alimenticio. La Fig. 3 muestra el diagrama general del proceso con maíz, como materia prima.



**Fig. 3 Diagrama general de la preparación de los medios de maíz y de los cultivos semisólidos.**

- |   |                    |    |                       |
|---|--------------------|----|-----------------------|
| 1 | Humedad            | 7  | Potencial eléctrico   |
| 2 | Turbidez del caldo | 8  | Carbohidratos totales |
| 3 | Peso               | 9  | Ácido láctico         |
| 4 | Cuenta viable      | 10 | Azúcares reductores   |
| 5 | pH                 | 11 | Diacetilo y A.G.V.    |
| 6 | Actividad acuosa   |    |                       |

Las condiciones de pretratamiento de maíz fueron las siguientes:

1. *Pesado y limpieza.* Se pesó el maíz, se limpió manualmente y se lavó con agua destilada.
2. *Nixtamalización (N).* Se utilizó agua destilada y cal; cuyas proporciones en relación con peso de maíz fueron de 1.5:1 y 0.035:1, respectivamente. La nixtamalización se inició calentando a presión atmosférica el agua de cal en una olla de aluminio hasta alcanzar los 80°C; después se agregó el maíz y se siguió calentando, agitando constantemente. Los tiempos de ebullición fueron de 5 y 20 min, según el caso en la 1ª serie de maíz. En la 2ª serie de maíz se calentó durante 5 min.
3. *Lavado y escurrido.* Se drenó el agua de cal en un escurridor. Luego se eliminó el pericarpio y el exceso de cal con lavados de agua destilada, dejando escurrir el nixtamal.
4. *Molienda húmeda.* El nixtamal húmedo se pesó y se molió en tres ciclos en un molino manual de tornillo para nixtamal (ATLAS).
5. *Secado.* Se determinó la humedad en muestras de harina con la técnica que se describe posteriormente. Este dato sirvió como base de cálculo para ajustar la humedad del harina posteriormente. En una estufa a 60° C se deshidrató el harina hasta obtener 8% de humedad.
6. *Molienda seca y tamizado.* El harina de nixtamal se molió en tres ciclos en un molino de aspas Braun Multipractic 2001, tamizándola cada vez. En la 1ª serie de maíz se obtuvo 50% de harina de partícula gruesa, con tamaño de partícula entre

0.42 – 0.84 mm (< malla # 20 y > malla # 40). El resto fue harina de partícula fina, que sí atravesó la malla # 40. En la 2ª serie de maíz se utilizó sólo partícula fina.

7. *Desengrasado*. Se realizó una extracción parcial de la grasa del harina de nixtamal, introduciendo lotes de 500 g de harina y hexano en una proporción de 1:1, en matraz de 1000 ml. El matraz se calentó a 68° C durante 4 h con perlas de ebullición, usando un sistema de reflujo. Después se decantó el hexano con la grasa, y se evaporó el resto de disolvente a 60°C. En la 1ª serie de maíz, esta operación se realizó a la mitad del harina solamente; y en la 2ª serie se desengrasó todo.
8. *Cocimiento*. Los lotes de harina se cubrieron y se enfriaron a 4°C mientras se realizaba la determinación de humedad en unas muestras. Después se adicionó agua destilada estéril para ajustar la humedad de todos los lotes a 70%. Las masas se mezclaron y se cocieron directamente en una olla de aluminio, moviendo constantemente. La mitad de los lotes de la 1ª serie de maíz se coció durante 25 min y la otra mitad durante 55 min. En la 2ª serie, el cocimiento fue de 25 min. Después, la humedad de las masas cocidas se volvió a ajustar por peso a 70%, con agua destilada estéril.
9. *Formulación y amasado*. Los medios fueron adicionadas con 0.03 g CaCO<sub>3</sub>/Kg de masa. En la 1ª serie de maíz se añadió 0.2 g extracto de levadura / Kg de masa a a todas las masas. En la 2ª serie de maíz, se agregó este ingrediente sólo a la mitad del medio, en la concentración mencionada. La humedad se ajustó en todos los medios a 78% con agua destilada estéril. En la 1ª serie de maíz se inocularon los lotes de masas preparadas con diferentes pretratamiento y

después se ajustó la humedad de cada uno a 78% con agua destilada estéril. Cada lote se mezcló (amasado) con utensilios estériles en la campana de flujo laminar, antes de distribuir en frascos. En la 2ª serie se ajustó la humedad de cada lote a nivel ligeramente inferior, se mezclaron por separado y se inocularon después de llenar cada frasco, de acuerdo al diseño experimental. La humedad final, considerando el agua añadida en el inóculo fue también de 78%.

## **DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

### **DISEÑOS EXPERIMENTALES DE LAS SERIES DE ALMIDÓN.**

Se realizaron tres series de cultivos sumergidos en medio de almidón, diseñadas como experimentos factoriales fraccionados y equilibrados (E.F.F.E.) de Taguchi (Ross, 1989), tal como se describe en el Anexo 1. Las variables de respuesta estudiadas fueron: las producciones de diacetilo y acetaldehído, el consumo de almidón y la producción de amilasa extracelular. Los cambios ocasionados a los 5 días de fermentación en cada variable de respuesta (valor final - valor inicial) fueron los datos evaluados en los Arreglos ortogonales (A.O.) Las dos primeras series consistieron en cultivos axénicos, aplicando los mismos tratamientos a cada cepa láctica: *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*. La 3ª serie fue de cultivos axénicos mixtos, con las mismas cepas. Los cultivos (experimentos) de la 1ª serie se realizaron por triplicado y los de las otras series, por duplicado. Los resultados de las

series se analizaron con los procedimientos estadísticos que se describen en el Anexo 1.

En la 1ª serie se evaluaron los efectos de factores reconocidos como compuestos y condiciones ambientales que influyen en las bacterias lácticas para producir consumir almidón, para incrementar su actividad amilolítica y para producir diacetilo. También se evaluó la posibilidad de producir acetaldehído a partir de treonina (Marshall, 1993). Los seis factores seleccionados fueron: **citrato, temperatura, glucosa, CaCO<sub>3</sub>, extracto de levadura y treonina**. Se evaluaron dos niveles de cada factor (Cuadro 1). También se evaluaron seis interacciones bifactoriales, dejando al factor F (treonina) independiente, por ser el que tenía menos relación con la producción de diacetilo. La gráfica lineal de la Fig. 4 muestra las interacciones bifactoriales propuestas para esta serie; de la cual se deriva el A.O. L16 del Cuadro 2.

**Cuadro No. 1**  
**Factores evaluados en la 1ª serie**  
**de cultivos axénicos en almidón**

| Factores |                   | Niveles |      | Unidades |
|----------|-------------------|---------|------|----------|
|          |                   | 1       | 2    |          |
| A        | Citrato           | 0       | 0.1  | %        |
| B        | temperatura       | 28      | 35   | °C       |
| C        | glucosa           | 0       | 1.0  | %        |
| D        | CaCO <sub>3</sub> | 0       | 0.02 | %        |
| E        | Ext. levadura     | 0.05    | 0.2  | %        |
| F        | treonina          | 0       | 0.1  | %        |

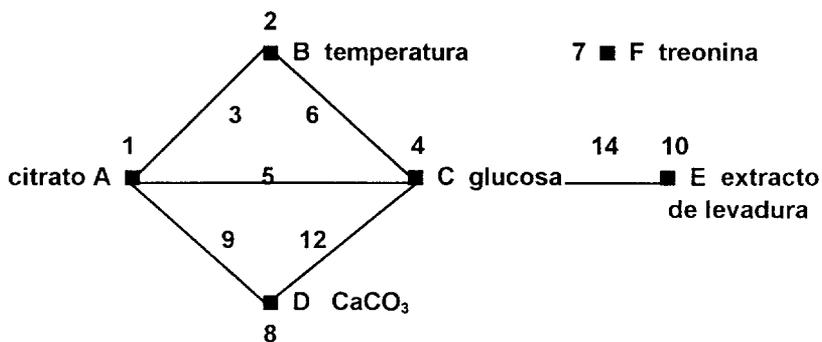


Fig. 4 Gráfica lineal L16 para la 1ª serie de cultivos axénicos en almidón

**Cuadro 2 Asignación de factores e interacciones a las columnas del arreglo ortogonal L16 de Taguchi en la 1ª serie de almidón**

| Experim.<br>No. | Factores e interacciones asignadas a cada columna del arreglo ortogonal para el análisis estadístico |            |           |     |            |     |     |                       |     |            |   |       |     |       |   |  |
|-----------------|--|------------|-----------|-----|------------|-----|-----|-----------------------|-----|------------|---|-------|-----|-------|---|--|
|                 | Citrato (%)  | Temp. (°C) | Gluc. (%) |     | Treon. (%) |     |     | CaCO <sub>3</sub> (%) |     | Ex Lev (%) |   | error |     | error |   |  |
|                 | A  | B          | AxB       | C   | AxC        | BxC | F   | D                     | AxD | E          |   |       | CxD | CxE   |   |  |
| 1               | 0  | 28         | 1         | 0   | 1          | 1   | 0   | 0                     | 1   | 0.05       | 1 | 1     | 1   | 1     | 1 |  |
| 2               | 0  | 28         | 1         | 0   | 1          | 1   | 0   | 0.02                  | 2   | 0.2        | 2 | 2     | 2   | 2     | 2 |  |
| 3               | 0  | 28         | 1         | 1.0 | 2          | 2   | 0.1 | 0                     | 1   | 0.05       | 1 | 2     | 2   | 2     | 2 |  |
| 4               | 0  | 28         | 1         | 1.0 | 2          | 2   | 0.1 | 0.02                  | 2   | 0.2        | 2 | 1     | 1   | 1     | 1 |  |
| 5               | 0  | 35         | 2         | 0   | 1          | 2   | 0.1 | 0                     | 1   | 0.2        | 2 | 1     | 1   | 2     | 2 |  |
| 6               | 0  | 35         | 2         | 0   | 1          | 2   | 0.1 | 0.02                  | 2   | 0.05       | 1 | 2     | 2   | 1     | 1 |  |
| 7               | 0  | 35         | 2         | 1.0 | 2          | 1   | 0   | 0                     | 1   | 0.2        | 2 | 2     | 2   | 1     | 1 |  |
| 8               | 0  | 35         | 2         | 1.0 | 2          | 1   | 0   | 0.02                  | 2   | 0.05       | 1 | 1     | 1   | 2     | 2 |  |
| 9               | 0.1  | 28         | 2         | 0   | 2          | 1   | 0.1 | 0                     | 2   | 0.05       | 2 | 1     | 2   | 1     | 2 |  |
| 10              | 0.1  | 28         | 2         | 0   | 2          | 1   | 0.1 | 0.02                  | 1   | 0.2        | 1 | 2     | 1   | 2     | 1 |  |
| 11              | 0.1  | 28         | 2         | 1.0 | 1          | 2   | 0   | 0                     | 2   | 0.05       | 2 | 2     | 1   | 2     | 1 |  |
| 12              | 0.1  | 28         | 2         | 1.0 | 1          | 2   | 0   | 0.02                  | 1   | 0.2        | 1 | 1     | 2   | 1     | 2 |  |
| 13              | 0.1  | 35         | 1         | 0   | 2          | 2   | 0   | 0                     | 2   | 0.2        | 1 | 1     | 2   | 2     | 1 |  |
| 14              | 0.1  | 35         | 1         | 0   | 2          | 2   | 0   | 0.02                  | 1   | 0.05       | 2 | 2     | 1   | 1     | 2 |  |
| 15              | 0.1  | 35         | 1         | 1.0 | 1          | 1   | 0.1 | 0                     | 2   | 0.2        | 1 | 2     | 1   | 1     | 2 |  |
| 16              | 0.1  | 35         | 1         | 1.0 | 1          | 1   | 0.1 | 0.02                  | 1   | 0.05       | 2 | 1     | 2   | 2     | 1 |  |

Los factores y niveles evaluados en la 2ª serie fueron: **A, CaCO<sub>3</sub> (0.01 y 0.03%); y B, temperatura (28° y 35°C)**. Estos factores y su interacción se asignaron a las columnas del A.O. L8 del Cuadro 3. Las variables de respuesta evaluadas en esta serie fueron: el consumo de almidón, el cambio en la actividad amilolítica extracelular y la producción de diacetilo.

En la 3ª serie de almidón (cultivos mixtos) se evaluó el efecto de la **temperatura a tres niveles: 28°, 32° y 35°C**. Este factor y sus niveles se asignaron al A.O. L9, que se presenta en el Cuadro 4. Las variables de respuesta en este caso fueron el consumo de almidón y la producción de diacetilo.

#### DISEÑOS EXPERIMENTALES DE LAS SERIES DE MAÍZ.

Después de haber definido los principales parámetros de composición y ambientales en un sistema modelo a base de almidón soluble, se realizaron dos series de cultivos en medios semisólidos a base de maíz nixtamalizado, también con diseños EFFE de Taguchi (Ross, 1989). Los cultivos en medio de maíz fueron todos heterogéneos, pues la masa de maíz no estéril sirvió como medio donde se inocularon las dos cepas estudiadas. La fermentación duró 5 días y cada cultivo se realizó por duplicado. Se analizaron estadísticamente las producciones de diacetilo y de ácido láctico en la fermentación (final – inicial).

**Cuadro 3**  
**Asignación de factores e interacciones a las columnas del**  
**arreglo ortogonal L8 de Taguchi en la 2ª serie de almidón**

| Experim. | Factores e interacción asignadas a cada columna del arreglo ortogonal |               |     |   |       |   |   |
|----------|---|---------------|-----|---|-------|---|---|
|          | CaCO <sub>3</sub><br>(%)  | Temp.<br>(°C) |     |   | error |   |   |
|          | A   | B             | AxB |   |       |   |   |
| No.      | 1   | 2             | 3   | 4 | 5     | 6 | 7 |
| 1        | 0   | 28            | 1   | 1 | 1     | 1 | 1 |
| 1'       | 0   | 28            | 1   | 2 | 2     | 2 | 2 |
| 2        | 0   | 35            | 2   | 1 | 1     | 2 | 2 |
| 2'       | 0   | 35            | 2   | 2 | 2     | 1 | 1 |
| 3        | 0.03  | 28            | 2   | 1 | 2     | 1 | 2 |
| 3'       | 0.03  | 28            | 2   | 2 | 1     | 2 | 1 |
| 4        | 0.03  | 35            | 1   | 1 | 2     | 2 | 1 |
| 4'       | 0.03  | 35            | 1   | 2 | 1     | 1 | 2 |

**Cuadro 4**  
**Asignación de factores e interacciones a las columnas del**  
**arreglo ortogonal L9 de Taguchi en la 3ª serie de almidón**

| Exp.<br>No. | Temp.<br>(°C) | error |   |   |   |
|-------------|---------------|-------|---|---|---|
|             | Factor A      | 1     | 2 | 3 | 4 |
| 1           | 28            | 1     | 1 | 1 | 1 |
| 1'          | 28            | 2     | 2 | 2 | 2 |
| 1''         | 28            | 3     | 3 | 3 | 3 |
| 2           | 32            | 1     | 2 | 3 | 3 |
| 2'          | 32            | 2     | 3 | 1 | 1 |
| 2'''        | 32            | 3     | 1 | 2 | 2 |
| 3           | 35            | 1     | 3 | 2 | 2 |
| 3'          | 35            | 2     | 1 | 3 | 3 |
| 3'''        | 35            | 3     | 2 | 1 | 1 |

En la 1ª serie se estimaron los efectos de algunas operaciones de pretratamiento del maíz para determinar la composición del medio de cultivo más apropiado para la fermentación. Se evaluaron cuatro factores: **molienda y tamizado, tiempo de nixtamalización, cocimiento del harina y desengrasado**. Las variables de respuesta evaluadas fueron el consumo de almidón y las producciones de ácido láctico, ácido butírico y diacetilo. Cada factor se evaluó en dos niveles de variación (Cuadro 5). También se determinó el efecto de tres interacciones bifactoriales. El factor D (desengrasado) se consideró independiente (sin interacción) por no haber encontrado evidencia en la literatura sobre su efecto en la producción de diacetilo o de ácido láctico, aunque era más claro que podría influir en la producción de ácido butírico.

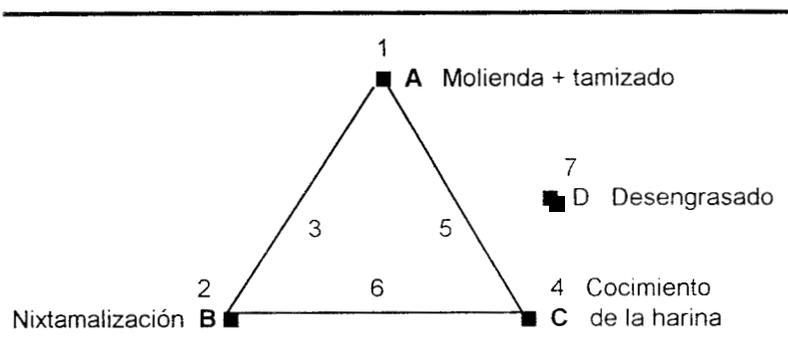
En la gráfica lineal de la Fig. 5 se presenta el diseño propuesto para la 1ª serie, mostrando la relación entre los factores e interacciones evaluadas. En el Cuadro 6, se presenta el A.O. L8 correspondiente.

**Cuadro No. 5**  
**Factores evaluados en la 1ª serie de cultivos semisólidos en maíz**

| FACTORES                           | NIVELES                 |                         | UNIDADES |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|
|                                    | 1                       | 2                       |          |
| <b>A</b> Molienda + tamizado       | < malla 40 <sup>a</sup> | > malla 40 <sup>b</sup> |          |
| <b>B</b> Tiempo de nixtamalización | 5                       | 20                      | min      |
| <b>C</b> Cocimiento de la harina   | 25                      | 55                      | min      |
| <b>D</b> Desengrasado              | no                      | si                      |          |

a) Tamaño de partícula de harina: < 0.42 mm

b) Tamaño de partícula de harina: > 0.42 mm (malla No. 40) y < 0.82 mm (malla No. 20)



**Fig. 5** Gráfica lineal L8 para la 1ª serie de cultivos semisólidos en maíz

**Cuadro 6**  
**Asignación de factores e interacciones a las columnas del**  
**arreglo ortogonal L8 de Taguchi en la 1ª serie de maíz**

| Experi-<br>mento | Factores e interacción asignadas a cada columna del arreglo ortogonal |                               |     |                          |     |     |                   |
|------------------|---|-------------------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-------------------|
|                  | Molienda +<br>Tamizado  | Nixtama-<br>lización<br>(min) | AxB | Coci-<br>miento<br>(min) | AxC | BxC | Desen-<br>grasado |
|                  | A   | B                             |     | C                        |     |     | D                 |
|                  | 1   | 2                             | 3   | 4                        | 5   | 6   | 7                 |
| 1                | < malla 40 <sup>a</sup>   | 5                             | 1   | 25                       | 1   | 1   | no                |
| 2                | < malla 40 <sup>a</sup>   | 5                             | 1   | 55                       | 2   | 2   | si                |
| 3                | < malla 40 <sup>a</sup>   | 20                            | 2   | 25                       | 1   | 2   | si                |
| 4                | < malla 40 <sup>a</sup>   | 20                            | 2   | 55                       | 2   | 1   | no                |
| 5                | > malla 40 <sup>b</sup>   | 5                             | 2   | 25                       | 2   | 1   | si                |
| 6                | > malla 40 <sup>b</sup>   | 5                             | 2   | 55                       | 1   | 2   | no                |
| 7                | > malla 40 <sup>b</sup>   | 20                            | 1   | 25                       | 2   | 2   | no                |
| 8                | > malla 40 <sup>b</sup>   | 20                            | 1   | 55                       | 1   | 1   | si                |

a) Tamaño de partícula de harina: < 0.42 mm

b) Tamaño de partícula de harina: > 0.42 mm y < 0.82 mm (malla 20).

La 2ª serie de maíz tuvo como objetivo determinar la influencia de algunos factores de carácter microbiológico en la fermentación, usando el medio de cultivo seleccionado en la 1ª serie. Los factores evaluados en la 2ª serie fueron: **extracto de levadura, relación inicial de cepas y tamaño del inóculo**, cada uno en dos niveles (Cuadro 7). Las variable de respuesta fue la producción de diacetilo. Para analizar los factores e interacciones, se propuso la gráfica lineal de la Fig. 6 y el A.O. L8 del Cuadro 8.

### **CONSERVACIÓN DE CEPAS.**

Para conservación a corto plazo, se sembró cada cepa en tubos con medio de conservación, sembrando por estría y piquete. Los tubos se incubaron a 32°C durante 48 - 72 h y después se refrigeraron a 4°C.

Para conservación a largo plazo, se prepararon cultivos superficiales en placas con medio de conservación (sin indicador de acidez) y se incubaron a 32°C por 48 -72 h. Las células se transfirieron asépticamente a viales que contenían 1 ml de un medio de conservación estéril (caldo de inóculo, 70% y glicerol, 30%); se suspendieron, se congelaron rápidamente a -40°C y se conservaron a -18°C.

**Cuadro No. 7**  
**Factores evaluados en la 2ª serie de cultivos semisólidos en maíz**

| FACTORES |   | NIVELES         |                 |
|----------|---|-----------------|-----------------|
|          |   | 1               | 2               |
| <b>A</b> | Extracto de levadura (%)  | 0               | 0.2             |
| <b>B</b> | Relación inicial de cepas:<br><i>Pd. pentosaceus</i> / <i>Lb. acidophilus</i> | 1:1             | 3:1             |
| <b>C</b> | Concentración inicial de biomasa<br>(U.F.C./ml)                               | $2 \times 10^5$ | $2 \times 10^6$ |

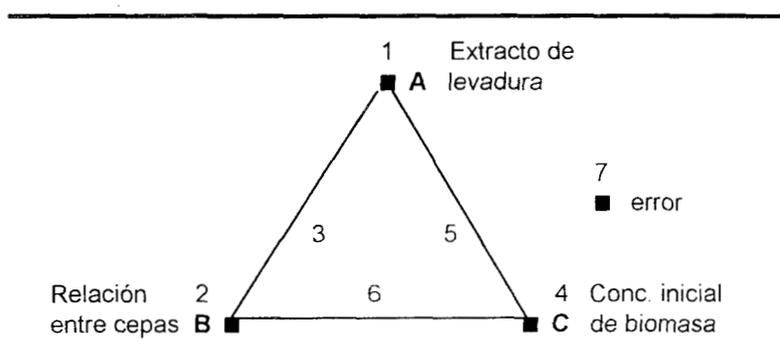


Fig. 6 Gráfica lineal L8 para la 2ª serie de cultivos semisólidos en maíz

**Cuadro 8**  
**Asignación de factores e interacciones a las columnas del**  
**arreglo ortogonal L8 de Taguchi en la 2ª serie de maíz**

| Experi-<br>mento | Factores e interacción asignadas a cada columna del arreglo ortogonal |                      |     |                                |       |     |   |
|------------------|---|----------------------|-----|--------------------------------|-------|-----|---|
|                  | Extracto<br>levadura  | Relación<br>de cepas |     | Conc.<br>inicial de<br>biomasa | error |     |   |
|                  | (%)   |                      |     | (U.F.C./ml)                    |       |     |   |
|                  | A   | B                    | AxB | C                              | AxC   | BxC |   |
| No.              | 1   | 2                    | 3   | 4                              | 5     | 6   | 7 |
| 1                | 0   | 1:1                  | 1   | $2 \times 10^5$                | 1     | 1   | 1 |
| 2                | 0   | 1:1                  | 1   | $2 \times 10^6$                | 2     | 2   | 2 |
| 3                | 0   | 3:1                  | 2   | $2 \times 10^5$                | 1     | 2   | 2 |
| 4                | 0   | 3:1                  | 2   | $2 \times 10^6$                | 2     | 1   | 1 |
| 5                | 0.2   | 1:1                  | 2   | $2 \times 10^5$                | 2     | 1   | 2 |
| 6                | 0.2   | 1:1                  | 2   | $2 \times 10^6$                | 1     | 2   | 1 |
| 7                | 0.2   | 3:1                  | 1   | $2 \times 10^5$                | 2     | 2   | 1 |
| 8                | 0.2   | 3:1                  | 1   | $2 \times 10^6$                | 1     | 1   | 2 |

## CONDICIONES DE CULTIVO EN LAS SERIES FACTORIALES.

Todos los procedimientos que requerían condiciones asépticas se realizaron en un cuarto estéril con campana de flujo laminar VECO 6HFL-A12.

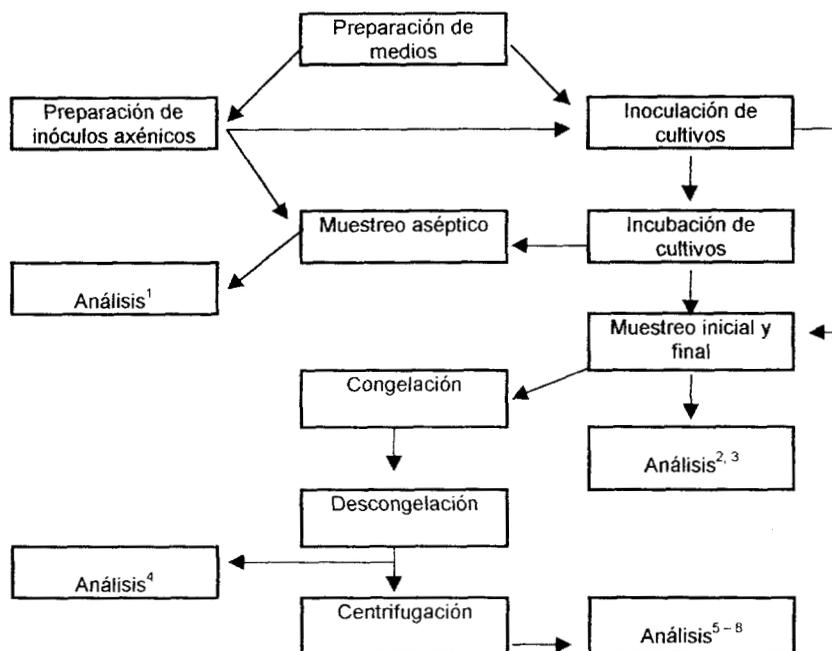
## CULTIVO DE LOS INOÓCULOS.

Se utilizó el caldo de almidón para los inóculos de las series de almidón y para los inóculos de la 1ª serie de maíz. Los matraces con medio se inocularon con asadas cargadas de cultivos axénicos de conservación de *Pd. pentosaceus* o de *Lb. acidophilus* y se incubaron a 32°C durante 48 h, agitando a 120 r.p.m.

En la 2ª serie de maíz, el diseño experimental requería de iniciar la fermentación con inóculos axénicos en concentraciones específicas, por lo que se realizaron con anticipación cultivos axénicos en medio de glucosa para caracterizar las curvas de crecimiento (Anexo 3). Posteriormente se realizaron cultivos axénicos que fueron utilizados como inóculos en las masas de maíz, cuantificando la concentración de bacterias lácticas añadida (Anexo 3).

## CULTIVOS EN LAS SERIES DE ALMIDÓN.

El diagrama de los cultivos en almidón se presenta en la Fig 7.



**Fig. 7 Diagrama general de los cultivos axénicos y mixtos a base de almidón**

- 1 Cuenta viable
- 2 Volumen
- 3 pH
- 4 Carbohidratos totales
- 5 Ácido láctico
- 6 Azúcares reductores
- 7 Diacetilo, ácido cítrico y acetaldehído por espectrofotometría
- 8 Cromatografía: diacetilo y A.G.V.

Se realizaron tres series con diseño factorial, usando matraces Erlenmeyer con 100 ml de caldo de almidón c/u. La incubación duró 5 días, agitando a 120 r.p.m. Las series 1ª y 2ª se realizaron con cultivos axénicos de cada cepa en caldo de almidón (*Pd. pentosaceus* o *Lb. acidophilus*). En estos casos, los caldos se inocularon con 1% (v/v) del inóculo axénico correspondiente, y se cultivaron en las condiciones indicadas en los diseños experimentales. Como en la 3ª serie sólo se iba a evaluar el efecto de la temperatura de incubación, se utilizó siempre el medio de almidón con la composición seleccionada en la serie precedente. Los cultivos mixtos se iniciaron añadiendo 0.5% de cada inóculo axénico en el medio de cada matraz. También se prepararon caldos inoculados sin incubar, como muestras iniciales en todas las series.

#### CULTIVOS EN LAS SERIES DE MAÍZ.

Se utilizaron medios semisólidos de harina de maíz nixtamalizado con una humedad ajustada de 78%, de acuerdo a la metodología indicada en la Fig. 3. La composición porcentual de esta harina corresponde a la típica de nixtamal, cuya composición en base seca contiene: extracto etéreo, 5.57; proteína cruda, 10.92; cenizas, 1.82; fibra cruda, 1.51, y extracto libre de nitrógeno, 80.18 (Carrillo-Pérez *et al.*, 1989). Se llevaron a cabo dos series de cultivos mixtos usando diseños factoriales.

En la 1ª serie, los lotes de masa preparadas en diferentes condiciones según el diseño del Cuadro 6 se inocularon con 0.5% (v/p) de cada inóculo axénico (*Pd. pentosaceus* ó *Lb. acidophilus*) en caldo de almidón, antes de ajustar la humedad.

Las masas se distribuyeron en porciones de 100 g en frascos de plástico de 125 ml y con tapón de rosca. En la 2ª serie, la humedad de cada lote de masa se ajustó al nivel indicado antes de inocular. Después, las masas se distribuyeron en porciones de 100 g en los frascos de plástico y se inocularon con inóculos axénicos preparados en caldo de glucosa, calculando el volumen de las alícuotas según el diseño del Cuadro 8. La mitad de los frascos de cada lote en las dos series se tomaron para el tiempo 0 días (muestra inicial), y el resto de los frascos se incubaron a 32°C durante 5 días (muestras finales).

Los cultivos en medio de maíz no eran axénicos, pero se prepararon en condiciones asépticas y con agua y utensilios estériles.

## **PREPARACIÓN DE MUESTRAS.**

Las muestras fueron las mismas unidades de fermentación (matraces con caldos o frascos con masas) de  $t = 0$  ó 5 días. Los cultivos de la 1ª serie de almidón se realizaron por triplicado, y los del resto de las series fue por duplicado. Salvo que se indique una variación, los análisis de cada unidad de fermentación se realizaron por duplicado, por lo tanto, cada dato analítico de la 1ª serie de almidón se refiere al promedio de seis réplicas; mientras que en las demás series de almidón o de maíz, cada muestra se refiere a cuatro. Se calculó la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar ( $s$ ) y el coeficiente de variación [C.V.=  $(\bar{x} / s) \times 100$ ] de cada uno de los parámetros analíticos al inicio y al final de cada fermentación. Para presentar la dispersión de los

datos de manera resumida se calculó el promedio de los coeficientes de variación ( C. V. ) de cada parámetro, en cada serie.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CULTIVOS EN ALMIDÓN.

La Fig. 7 muestra el diagrama de preparación de muestras seguido en los cultivos de almidón. Se midió el volumen de los caldos en cada matraz y el pH. De cada matraz se tomó una alícuota de 30 ml y se congeló a  $-18^{\circ}\text{C}$  para determinar posteriormente el contenido de carbohidratos totales. El resto del caldo se centrifugó en frascos de 250 ml en una centrífuga Beckman J<sub>2</sub>-M<sub>1</sub>, con rotor de ángulo fijo JA-14, a una velocidad de 5000 r.p.m. (3836 x g) por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo para clarificarlo mejor. El sobrenadante final se congeló a  $-18^{\circ}\text{C}$ , en fracciones.

Para realizar los análisis del caldo clarificado se descongelaba la fracción respectiva dejándola en el refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ , por una noche. Se determinaron los contenidos de: azúcares reductores, ácido láctico, diacetilo y A.G.V. (ácidos acético, propiónico y butírico). En los caldos clarificados de la 1ª serie se determinaron también las concentraciones de ácido cítrico y acetaldehído, y en los de las series 1ª y 2ª, las actividades amilolíticas extracelulares. En la 3ª serie se cuantificaron las bacterias lácticas viables en los inóculos axénicos y en los caldos finales de la serie, por lo que se tomaron muestras asépticamente antes de realizar cualquier otra determinación.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CULTIVOS EN MAÍZ.

El diagrama de la preparación de muestras de maíz se presenta en la Fig. 3. En las dos series se pesaron los frascos con masa, sus contenidos se mezclaron durante 2 min en condiciones asépticas. Después de medir el pH de las masas, se separaron en fracciones que se congelaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras se descongelaron y se realizaron los análisis químicos: carbohidratos totales, azúcares reductores, ácido láctico, A.G.V. y diacetilo. En la 2ª serie de maíz se realizó además la cuenta viable de bacterias lácticas, por lo que después de mezclar la masa de cada frasco, se tomaron las muestras asépticamente. En el resto de la masa se midió el pH y la actividad de agua ( $a_w$ ) antes de congelar la masa. Luego se procedió a realizar los análisis, como en la 1ª serie.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

### DETERMINACIÓN DE LAS CUENTAS VIABLES DE BACTERIAS LÁCTICAS.

Se pesó exactamente 1.00 g de masa por duplicado, y se dispersó en una solución diluyente estéril de fosfatos, preparando diluciones de  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ . Alícuotas de 0.1 ml de las suspensiones se dispersaron por duplicado en la superficie de placas del medio de conservación (con indicador de acidez). Las placas se incubaron a  $32^{\circ}\text{C}$ , durante 48 - 72 h. El número de colonias se contó con un aparato cuenta colonias

(Sol-Bat HRT-50-60), la producción de acidez se confirmó por el cambio de color del medio y se calculó la cuenta viable de bacterias lácticas, como U.F.C./ml.

## **MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS.**

Los análisis químicos de cada muestra se realizaron por duplicado. En las técnicas espectrofotométricas, las curvas estándares de 5 puntos se determinaron por triplicado ( $r^2 > 0.99$ ), leyendo en un espectrofotómetro JENWAY modelo 6105 U.V./Vis.

### **DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.**

Se deshidrataron muestras de 5.0 g de las masas de nixtamal o de harina que se había desengrasado, calentando a 90°C hasta alcanzar un peso constante. Se cuantificó la humedad de las muestras por diferencia de peso (Less, 1984).

### **MEDICIONES DE VOLÚMENES Y DE PESOS**

Se midieron los volúmenes de los caldos de cultivos de almidón con probetas de dimensiones apropiadas. Para la medición y transferencia de volúmenes pequeños y exactos se utilizaron las micropipetas automáticas: Oxford® Sampler Sistem de

volumen ajustable de 10 - 50  $\mu\text{l}$ ; Brand Transsferpette® de volumen fijo de 50  $\mu\text{l}$ , y Gilson® P500 de volumen variable de 0 - 5 000  $\mu\text{l}$ .

Las mediciones de los pesos de maíz, harinas, masas y frascos se realizaron con una balanza digital OHAUS, modelo GT4800. Los pesos de los reactivos para los análisis químicos se midieron con una balanza analítica SAUTER GmbH D-7470.

#### DETERMINACIÓN DEL pH.

Se midió el pH en las muestras líquidas y sólidas con un potenciómetro Conductronic pH 20.

#### DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ ) DE LAS MASAS DE MAÍZ.

Se tomaron muestras de masa aproximadamente de 5 g y se colocaron en celdas especiales que se introdujeron en un aparato AQUA-LAB CX-2 Decagon Devices Inc. que había sido calibrado con agua desionizada y con una solución saturada de NaCl. La actividad de agua de cada muestra y su temperatura de equilibrio se leyeron directamente.

## CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.

Los carbohidratos totales se determinaron con el reactivo de antrona (White y Kennedy, 1986). La curva estándar se preparó con glucosa en un rango de 0 – 50  $\mu\text{g}$  y se leyó la absorbancia a 625 nm. Las muestras de caldo de almidón sin centrifugar se descongelaron calentándolas en baño maría a 60°C por 30 min, y las de maíz dejándola en el refrigerador a 4°C, por una noche. Se tomó 1 ml de caldo (a 20°C) o 1 gramo de masa; se prepararon diluciones apropiadas y se desarrolló el color para cuantificar los carbohidratos totales de las muestras, empleando una curva estándar

## CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.

Se preparó una curva estándar de lactato de litio, equivalente a 0 – 50  $\mu\text{g/ml}$  de ácido láctico, siguiendo el procedimiento de Barnett (1951). Se desarrolló el color con *p*-hidroxibifenilo y  $\text{CuSO}_4$ , la absorbancia se leyó a 560 nm.

Se descongelaron las muestras y se tomaron 0.5 - 2.0 ml de los caldos clarificados de almidón y 0.5 – 2.0 g de las masas de maíz, dependiendo del contenido esperado del ácido. Las muestras fueron diluidas apropiadamente con agua destilada y se clarificaron con  $\text{Ca(OH)}_2$  antes de determinar la concentración de ácido láctico empleando una curva estándar.

## CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

La concentración de azúcares reductores de la curva estándar de glucosa (0 – 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) se determinó con el reactivo ácido 3,5–dinitrosalicílico (D.N.S.), de acuerdo al procedimiento descrito por Miller (1959).

Se descongelaron las muestras y se tomó 1.0 ml de los caldos clarificados de almidón ó 2.0 g de las masas de maíz. Las muestras se diluyeron con agua destilada apropiadamente para cuantificación los azúcares reductores con una curva estándar.

## ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA CUANTIFICAR ACIDO CÍTRICO, ACETALDEHÍDO Y DIACETILO.

Los contenidos de citrato y de acetaldehído se cuantificaron sólo en la 1ª serie de almidón. La cuantificación de diacetilo por espectrofotometría se realizó en la 1ª y 2ª series de almidón.

La cuantificación de ácido cítrico se realizó de acuerdo al método 57 del A.O.A.C. (1980), con los reactivos piridina y anhídrido acético. Se preparó la curva estándar en un rango de 0 – 200  $\mu\text{g/ml}$  de ácido cítrico y se leyó la absorbancia a 428 nm. Alícuotas de 1.0 ml de caldo centrifugado de almidón se diluyeron apropiadamente y fueron tratadas con ácido tricloroacético para precipitar las proteínas. El contenido de ácido cítrico se determinó con una curva estándar.

Para analizar el acetaldehído se realizó una curva estándar en un rango de concentración de 0 – 100  $\mu\text{g/ml}$ . El color se desarrolló con nitroprusiato de sodio y piperidina, y se leyó a 570 nm, de acuerdo al método de Rebelein (Amerine y Ough, 1980). Se analizaron muestras de 1.0 ml de caldo centrifugado de almidón diluido apropiadamente, con una curva estándar.

El diacetilo fue determinado por el método de Voges-Proskauer (McFaddin, 1980), modificado con el fin de prevenir la oxidación de acetoina. La principal modificación consistió en utilizar una solución de KOH al 1% y creatinina (Anexo 2) en lugar de una de KOH al 40%. También se prepararon soluciones de  $\alpha$ -naftol y de diacetilo (Anexo 2).

La curva estándar de diacetilo tuvo una concentración de 0 – 60  $\mu\text{g/ml}$ . A un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se adicionó 1 ml de la solución de diacetilo correspondiente, 1 ml de agua desionizada, 2 ml del reactivo de  $\alpha$ -naftol y 2 ml del reactivo de KOH, mezclando suavemente después de cada adición. Se taparon los tubos y se dejaron reposar en la obscuridad por 15 min. Se leyó la absorbancia a 530 nm. Se utilizó 1 ml de cada caldo clarificado de almidón de las series 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> para realizar este análisis.

## CUANTIFICACIÓN DE DIACETILO Y DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (ACÉTICO, PROPIÓNICO Y BUTÍRICO) POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.

Se analizaron los compuestos volátiles por cromatografía gaseosa en todos los cultivos, menos en la 1ª serie de almidón. Se empleó un cromatógrafo de gases analítico Hewlet-Packard, modelo 5890, con detector de ionización de flama y un integrador Shimatzu C-R3A Chromatopac. La columna fue: Megaboro AT-1000, 10 m x 0.53 mm y película: 1.2  $\mu\text{m}$ . Condiciones: Inyector,  $T_{\text{Iny.}} = 200^{\circ}\text{C}$ ; columna,  $T_1 = 80^{\circ}\text{C}$ ,  $t_1 = 2$  min,  $T_2 = 150^{\circ}\text{C}$ ,  $t_2 = 6$  min,  $R = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $N_2 = 5$  ml/min; detector,  $T_{\text{Det.}} = 220^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{Eq}} = 3$  min,  $\text{Aten.} = 1.0$ ,  $H_2 = 20 - 30$  ml/min,  $\text{aire} = 200 - 300$  ml/min; integrador, Prog. 5,  $\text{Aten.} = 1.0$ ,  $\text{Vel. carta} = 1$  cm/min,  $T_{\text{Final}} = 10$  min.

Se prepararon soluciones estándares mixtas con diacetilo, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, en concentraciones entre 1 y 10 mM / l de cada componente (Anexo 2). Se inyectaron 0.3  $\mu\text{l}$  de cada solución estándar mixta al cromatógrafo por quintuplicado, para obtener las curvas estándares.

Alícuotas de 1 ml de los caldos clarificados de almidón se mezclaron con 25  $\mu\text{l}$  de la solución de HCl en un vial de 2 ml. Los viales se centrifugaron durante 30 min, a 5000 r.p.m. (3836 x g) y  $4^{\circ}\text{C}$ , en una centrifuga Beckman,  $J_2\text{-M}_1$ , utilizando el rotor  $J_A\text{-14}$  y adaptadores especiales para viales. El sobrenadante se vertió en otro vial de 2 ml y se guardó en congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante un día. Las muestras se inyectaron por duplicado (0.3  $\mu\text{l}$ ) al cromatógrafo. Entre muestra y muestra se inyectaba 0.1  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico concentrado (Baker Analyzed, 88%) para acidificar la columna. Se

calculó la concentración de los cuatro volátiles en las muestras con ayuda del integrador.

Se pesaron porciones de 1 g de masa de maíz en tubos de centrifuga de 50 ml; se adicionaron 4 ml de agua desionizada y se cubrieron los tubos con parafilm. La suspensión se mezcló con un vortex Lab-Line Instruments Super Mixer y luego se centrifugó durante 30 min a 3000 r.p.m. ( $919.66 \times g$ ) en una centrifuga de mesa Solbat, J-12, a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se vertió en un vial de 2 ml, al cual se le adicionaron 25  $\mu$ l de la solución de HCl. Los viales se centrifugaron durante 30 min, a 5000 r.p.m. ( $3913.0 \times g$ ) y 4°C, en una centrifuga Beckman, J2-M1, utilizando el rotor JA-14, con adaptador para viales. El sobrenadante se transfirió a otro vial de 2 ml y se guardaron en congelación a 2°C. Las muestras se prepararon por duplicado un día antes del análisis en el cromatógrafo, siguiendo el procedimiento descrito para las muestras de almidón.

#### DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES AMIOLÍTICAS EXTRACELULARES.

Se determinó la actividad de las amilasas extracelulares en las series 1ª y 2ª de almidón, mediante el análisis de los azúcares reductores liberados después del ensayo enzimático.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con un método que es modificación de los utilizados por Champ *et al*, (1983); Li y Chan (1983), y Sen y Chakrabarty (1984).

Se adicionaron 0.7 ml de una solución buffer de fosfatos 0.05 M con pH 5.5 (Anexo 2) a un tubo de ensayo; después se vertieron 2 ml de la solución de almidón en el mismo buffer (Anexo 2) y 1.5 ml de la solución enzimática (caldo clarificado). Después de mezclar, la solución se incubó en baño maría por 10 min, a 37°C para *Lb. acidophilus* y a 30°C para *Pd. pentosaceus*. La reacción enzimática se interrumpió adicionando 0.3 ml de una solución fría de NaOH 2 M y enfriando en un baño de hielo. La cuantificación de los azúcares liberados se llevó a cabo vertiendo 1 ml de la mezcla de reacción en otro tubo de ensayo, desarrollando color con el reactivo de D.N.S. (Miller, 1959). Se preparó una curva estándar siguiendo la metodología descrita, con la única diferencia de que se substituyó el caldo clarificado por una serie de soluciones estándares de glucosa con concentraciones de 0 – 4.5 mg/ml en el mismo buffer (Anexo 2). Después del ensayo enzimático se determinó la concentración de glucosa conforme al método de D.N.S. (Miller, 1959), obteniendo un rango de concentración de glucosa en la curva estándar de 0 – 300 µg/ml.

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1.0 µmol de azúcares reductores (como glucosa) por minuto, bajo las condiciones indicadas anteriormente.

## CINÉTICA DE CULTIVOS MIXTOS EN MEDIO DE MAÍZ.

### CONDICIONES DE CULTIVO Y ANÁLISIS.

Después de haber identificado las condiciones de fermentación láctica mixta más recomendables para producir diacetilo en un medio a base de maíz, se realizó una serie de cultivos para determinar la cinética de producción de este volátil y de otros parámetros importantes.

Se realizó primero un cultivo reproduciendo el medio y las condiciones ambientales fijadas en la 2ª serie de maíz, siguiendo el procedimiento de la Fig. 3. La masa de maíz nixtamalizado no estéril se inoculó con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* en una relación de 3:1, dando una cuenta de  $2 \times 10^6$  U.F.C./g de masa en el tiempo cero. El cultivo se incubó a 32°C, muestreando cada 12 h, y se interrumpió al completar 200 h. Como sus resultados indicaron que los cambios más importantes ocurrieron en los primeros días, se diseñó el 2º cultivo muestreando los dos primeros días cada 3 h, y luego abriendo los períodos de muestreo de 6 a 12 h, interrumpiendo a las 120 h. Ambos cultivos se realizaron por duplicado.

Se obtuvo el perfil químico y microbiológico de la fermentación tomando muestras por duplicado. En cada muestra se determinaron los siguientes parámetros: cuentas viables; pH, redox; carbohidratos totales, azúcares reductores, ácido láctico, A.G.V. y diacetilo. La mayor parte de los análisis se realizaron conforme a la metodología descrita, aclarando cuando se haya realizado algún cambio. Como

ambos cultivos fueron realizados en las mismas condiciones, sus resultados se conjuntaron, pues representaban al mismo sistema fermentativo.

#### CUENTAS VIABLES.

La metodología de cuenta viable de bacterias lácticas descrita previamente fue aplicada en los inóculos axénicos y en cada muestra de maíz, en condiciones asépticas. Como los cultivos no eran axénicos, algunas de las placas de agar MIA sembradas con muestras de las primeras 48 h de fermentación, mostraron desarrollo de otros grupos microbianos. Estos grupos microbianos provenientes de la masa también se contaron, considerando su morfología colonial diferencial, su morfología microscópica con tinción de Gram y la prueba de la enzima catalasa (McFaddin, 1980).

#### DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ELÉCTRICO ( $E_{h_0}$ ) DE LAS MASAS DE MAÍZ.

Después de medir el pH de las masas y antes de congelarlas (Fig. 3) se determinó el potencial eléctrico ( $E_h$ ); para lo cual se calibró el potenciómetro Conductronic pH 20 a un valor estándar,  $E_{h_0} = 0$  mv, usando un puente eléctrico y la escala de potencial eléctrico relativo (relmv). Luego se midieron los valores de  $E_h$  de las masas a 20°C, usando el electrodo combinado de redox Corning 476080, estándar para E.E.U.U.A.A. Éste se introdujo en cada muestra y se dejó reposar durante 5 min

aproximadamente, hasta obtener una lectura estable en la escala de potencial eléctrico absoluto (mv).

## **CULTIVOS PARA DETERMINAR LAS ACTIVIDADES Y LOCALIZACIÓN DE LAS AMILASAS EN LAS CÉLULAS.**

### **CONDICIONES DE CULTIVO.**

Se realizó un cultivo axénico de cada cepa en caldo de almidón (por duplicado) con el objetivo de recuperar células y diferenciar las actividades de las amilasas: extracelulares, ligadas a la pared celular y a la fracción intra-citoplásmica.

La composición del medio fue similar a la usada para el inóculo, pero reduciendo la concentración de almidón soluble a 5 g/l, para disminuir la concentración de almidón residual en la fermentación. Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 160 ml del medio, se esterilizaron en autoclave y se les aplicó la prueba de esterilidad, como se indicó previamente.

Se inocularon 6 matraces con 1% (v/v) de su respectivo inóculo, 4 de ellos se incubaron a 28°C, agitando a 120 r.p.m. durante 5 días y 2 se analizaron sin incubar (muestras iniciales). Los caldos fermentados de cada cepa se juntaron asépticamente por pares para incrementar la cantidad de biomasa, dando muestras finales de 360 ml (por duplicado).

## MUESTREO Y CENTRIFUGACIÓN.

Se tomaron asépticamente alícuotas de los caldos finales para determinar la cuenta viable de bacterias lácticas, siguiendo los procedimientos descritos previamente. Después se midieron los volúmenes y el pH de los caldos iniciales y finales; de ellos se separó una fracción de 30 ml que se congeló a  $-18^{\circ}\text{C}$  para el análisis posterior de carbohidratos totales. El resto de cada caldo se centrifugó en dos ciclos consecutivos, usando las condiciones indicadas previamente. El sobrenadante se recuperó y congeló para realizar luego los análisis químicos y el ensayo de la amilasa extracelular.

Para purificar las células de cada muestra, el sedimento de centrifugación de cada muestra final se dispersó en 10 ml de buffer de fosfatos 0.05 M (pH=5.5). La suspensión se recolectó en tubos de 50 ml y se centrifugó con un rotor  $J_A-20$ , a 5000 r.p.m. ( $3024 \times g$ ), por 30 minutos y  $4^{\circ}\text{C}$ . Al decantar el buffer, se le realizó una prueba de presencia de almidón con el reactivo de yodo - lugol. Este ciclo de lavado de células y prueba de yodo se repitió 3 veces más, hasta que la reacción al yodo fue negativa. Se determinó entonces el peso total de biomasa húmeda por muestra. Los paquetes de células lavadas se congelaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## RUPTURA DE CÉLULAS.

De cada muestra de células congeladas se pesaron 2 porciones de 0.5000 g, transfiriéndolas cuantitativamente a un tubo macerador manual Pyrex®, previamente

introducido en un baño de hielo con sal, a 0°C. Se realizó la ruptura de las células mediante 4 ciclos de maceración de 10 min c/u, interrumpiendo para arrastrar la muestra al fondo del tubo y hacer más uniforme el proceso. La ruptura total de las células se verificó observando muestras al microscopio óptico. La suspensión se transfirió cuantitativamente a un vial de 2 ml y se aforó a 1.5 ml con buffer de fosfatos 0.2 M (pH 5.5). Los viales se centrifugaron a 10 000 r.p.m. (15 344 x g) durante 30 min y 4°C, en una centrifuga Beckman, J<sub>2</sub>-M<sub>1</sub>, con rotor JA-14 y adaptadores especiales para viales.

El sobrenadante (fracción intracelular) se separó del sedimento (células rotas), transfiriéndolo cuantitativamente a un tubo de vidrio volumétrico de 1 ml y aforando con el buffer de fosfatos 0.2 M a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1.5 ml del buffer en el vial, y se centrifugó para lavado de células por cuatro ciclos, en las mismas condiciones. El sedimento final (fragmentos de pared y membrana citoplásmica) se transfirió cuantitativamente a un tubo volumétrico de 5 ml, y se aforó con el buffer de fosfatos 0.2 M a 4°C.

#### DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES AMILOLÍTICAS.

La actividad amilolítica extracelular fue determinada en los caldos de cultivo clarificados de acuerdo al procedimiento descrito previamente. Los ensayos enzimáticos de las amilasas relacionadas con la estructura celular también tuvieron dos etapas, la hidrólisis y la cuantificación de los azúcares liberados.

La hidrólisis se llevó a cabo modificando las técnicas propuestas por Li y Chan (1983); Sen y Chakrabarty (1984); Shimazu *et al.* (1985). Se adicionó a un tubo de ensayo 1 ml de una solución de almidón en buffer de fosfatos 0.2 M (Anexo 2), y luego 1 ml de la fuente enzimática (solución intracelular o suspensión de sedimentos de células rotas). Después de agitar, la mezcla se incubó en baño maría durante 10 min, a 37°C para *Lb. acidophilus*, y a 30°C para *Pd. pentosaceus*. La reacción se interrumpió adicionando 0.2 ml de una solución fría de NaOH 2 M y enfriando en un baño de hielo. La cuantificación de los azúcares liberados se llevó a cabo con el método de D.N.S. (Miller, 1959) en 1 ml de la mezcla. Se preparó una curva estándar de la misma manera, pero se substituyó la fuente de enzima por una solución estándar de glucosa en buffer de fosfatos 0.2 M (Anexo 2), a fin de tener un rango de concentración de glucosa de 0 – 1.1 mg/ml. En la etapa de desarrollo de color, la curva tuvo un rango de concentración de 0 – 500 µg/ml. Los datos de azúcares reductores liberados en las mezclas de reacción se corrigieron para el cultivo de origen, utilizando los datos de concentración de biomasa húmeda y de cuenta viable.

Las determinaciones de las curvas estándares se realizaron por triplicado y las de las muestras por duplicado.

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de azúcares reductores (como glucosa) por minuto, bajo las condiciones indicadas anteriormente.

## ANÁLISIS QUÍMICOS.

En el caldo de cultivo que no se centrifugó se analizó el contenido de carbohidratos totales, y en el caldo clarificado se analizaron los siguientes parámetros: lactato, azúcares reductores, A.G.V. y diacetilo.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CULTIVOS EN MEDIOS A BASE DE ALMIDÓN.

#### 1ª SERIE.

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de algunos factores nutrimentales y ambientales: **A: citrato; B: temperatura; C: glucosa; D:  $\text{CaCO}_3$ ; E: extracto de levadura; F: treonina**, y algunas de sus interacciones (Cuadro 1 y Fig. 4), en el consumo de almidón, en la actividad amilolítica extracelular y en la producción de diacetilo. Esta serie fue realizada simultáneamente con cultivos axénicos sumergidos a base de almidón (medio basal, g/l de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada: almidón soluble, 10; peptona de caseína, 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 y solución de vitaminas y minerales, 5 ml.; pH = 6.5), inoculando ya sea con *Pd. pentosaceus* o con *Lb. acidophilus*, de acuerdo a la metodología indicada en el Capítulo de Métodos. El diseño experimental se muestra en la gráfica lineal de la Fig. 4, que corresponde al A.O. L16 del Cuadro 2, propuestos ambos en base a la metodología de Taguchi (Ross, 1989).

Los 16 experimentos correspondientes a cada microorganismo fueron realizados por triplicado. Se determinaron los siguientes parámetros al inicio y al final de cada fermentación por duplicado: pH, concentraciones de ácido láctico, ácido cítrico, carbohidratos totales, azúcares reductores, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y diacetilo. También se calculó el contenido de almidón en cada muestra sustrayendo el dato de azúcares reductores al de carbohidratos totales. El error experimental se calculó con los coeficientes de variación (C.V.) de los datos iniciales y finales por separado, de cada cultivo. Con estos valores se calcularon los valores promedio por parámetro ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ), para poder presentarlos de manera resumida. También se determinaron los cambios originados por la fermentación, considerando la diferencia entre el valor promedio final e inicial.

*Cultivos con Pd. pentosaceus.* En el Cuadro 9 se presenta una sinopsis de los resultados experimentales más importantes de la 1ª serie de cultivos en almidón, con *Pd. pentosaceus*. En cada parámetro se considera la media de los valores iniciales de la serie, el rango observado en los valores finales y el cambio más notable después de la fermentación. De todos los coeficientes de variación  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$  calculados en los parámetros analíticos, sólo el correspondiente al diacetilo sobrepasó el valor máximo recomendable (10%), debido a que se empleó el método fotocolorimétrico. Esto se debe a que hay una variación relativa mayor cuando las concentraciones de diacetilo son muy bajas, como ocurrió en las muestras iniciales.

**Cuadro 9**  
**Resumen de los datos analíticos de la 1ª serie de cultivos**  
**en almidón con *Pd. pentosaceus***

| Parámetros analizados         | Iniciales<br>( Mín. / Máx. ) | Finales<br>( Mín. / Máx. ) | C. V. <sup>c)</sup><br>( % ) | Mayor cambio <sup>d)</sup> |   |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|---|
|                               |                              |                            |                              | valor<br>(Fin. - Ini.)     | # Exp.  |
| pH                            | 6.40 6.9                     | 4.70 6.92                  | 0.68                         | -2.03                      | 4<br>Cit 0, Temp 28, Glu 1.0, Tr 0.1,<br>CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex Lev. 0.2  |
| Ac. cítrico (g/l)             | 0 1.46                       | 0.88 1.22                  | 2.73                         | -0.97                      | 14<br>Cit 0.1, Temp 35, Glu 0, Tr 0,<br>CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex Lev. 0.05  |
| Ac. láctico (g/l)             | 0 0.17                       | 0.12 1.71                  | 5.11                         | 1.56                       | 8<br>Cit 0, Temp 35, Glu 1.0, Tr 0,<br>CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex Lev. 0      |
| Carb. Tot. (g/l)              | 19.19 35.80                  | 9.83 26.50                 | 5.44                         | -17.26                     | 13<br>Cit 0.1, Temp 35, Glu 0, Tr 0,<br>CaCO <sub>3</sub> 0, Ex Lev. 0.05.    |
| Azúc. Red. (g/l)              | 2.92 7.08                    | 2.94 5.41                  | 1.19                         | -2.91                      | 15<br>Cit 0.1, Temp 35, Glu 1.0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex Lev. 0.2. |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)   | 14.63 32.81                  | 3.26 21.97                 | --                           | -18.30                     | 11<br>Cit 0.1, Temp 28, Glu 1.0, Tr 0,<br>CaCO <sub>3</sub> 0, Ex Lev 0.05.   |
| Diacetilo <sup>b)</sup> mg/l) | 0 2.11                       | 1.23 8.31                  | 31.11                        | 7.77                       | 15<br>Cit 0.1, Temp 35, Glu 1.0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex Lev. 0.2. |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red. en c/experimento

b) Determinado por Voges - Proskauer modificado.

c) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro. Cada experimento inicial o final se calculó por: C. V.= (Desv. Est./Prom.) • 100.

d) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie, después de la fermentación

Los datos finales de pH variaron notablemente dentro de la misma serie, debido al efecto de la composición del medio, puesto que los mayores descensos se observaron en los cultivos con glucosa añadida, pero sin citrato (Cuadro 2). Los experimentos que contenían citrato en ausencia de glucosa, presentaron un incremento de pH al término de la fermentación, debido al consumo de este ácido. Por otro lado, no se observó diferencia de regulación interna del pH por el  $\text{CaCO}_3$  en los niveles utilizados, por lo que se consideró conveniente ampliar el rango de concentración de este componente en la serie siguiente. El experimento que presentó la mayor disminución de pH inició sin citrato, pero con glucosa y extracto de levadura, y se incubó a una temperatura de 28°C.

Se observó un consumo moderado de citrato en todos los experimentos con nivel 2, siendo ligeramente más pronunciado en aquellos incubados a 35°C. El experimento que presentó el mayor consumo de citrato fue el que no contenía glucosa ni extracto de levadura, y se incubó a 35°C.

El valor más alto de ácido láctico determinado en la serie fue 1.71 g/l, valor pequeño si se compara con los observados usualmente en las fermentaciones lácticas de medios con azúcares simples (9 - 12 g/l). Este resultado indica que los carbohidratos complejos (de menor eficiencia) fueron los principales proveedores de energía para *Pd. pentosaceus*. Como era de esperarse, la presencia de glucosa y extracto de levadura (como fuente de factores de crecimiento), incrementaron la producción del ácido láctico, pero el  $\text{CaCO}_3$  no tuvo un efecto notable en los niveles utilizados. La mayor producción

de este ácido se observó en el experimento con presencia de glucosa y extracto de levadura, incubando a 35°C y sin citrato.

Se determinaron por separado los contenidos de carbohidratos totales y los de azúcares reductores, a fin de poder calcular los posibles consumos de carbohidratos no - reductores, considerados en este trabajo como consumo de almidón *in situ*, lo que denotaría la capacidad hidrolítica de *Pd. pentosaceus*. Los experimentos que no tuvieron glucosa desde el inicio presentaron generalmente un consumo mayor de carbohidratos totales; entre ellos, el más notable fue incubado a 35°C, además de tener citrato y extracto de levadura. En cuanto al contenido de los azúcares reductores, se observaron cambios generalmente pequeños después de la fermentación, ya sea de incremento o decremento en sus valores, debido a que se presentaron simultáneamente un consumo y una producción por hidrólisis del almidón. Se observó que en aquellos experimentos que contenían inicialmente glucosa y que se incubaron a 35°C, se presentó una disminución mayor de azúcares reductores. El cultivo que tuvo el descenso más notable de azúcares reductores, además de cumplir con estas condiciones, tuvo presencia de citrato y extracto de levadura.

Aunque *Pd. pentosaceus* si consumió almidón *in situ* (carbohidratos totales menos azúcares reductores), no se detectó actividad amilolítica extracelular en el ensayo enzimático. Esto fue interpretado como un indicio de que la amilasa de *Pd. pentosaceus* responsable de la hidrólisis del almidón en la fermentación pudiera estar ligada a la pared celular, y no libre en el caldo. Para evaluar el efecto de los factores e interacciones del diseño en el consumo de almidón *in situ* como variable de respuesta,

se aplicó un análisis estadístico siguiendo la metodología de Taguchi (Ross, 1989); los valores de consumo de almidón por experimento se presentan en el Cuadro 10. El análisis de varianza y el cálculo de contribuciones porcentuales del Cuadro 11 mostraron que el factor con mayor efecto significativo sobre el consumo de almidón fue la glucosa y en menor grado, la interacción de este factor con el  $\text{CaCO}_3$ . Los valores promedio de la variable de respuesta (consumo de almidón) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 8. En el Cuadro 12 se indican los niveles seleccionados, que fueron: la ausencia de glucosa, y la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en su nivel alto. El resultados de la ecuación de estimación de medias indica el valor estimado de la variable de respuesta que se obtendría en las condiciones de cultivo seleccionadas.

En esta serie, el diacetilo fue determinado por el método fotocolorimétrico. Aunque algunos de los cultivos tuvieron condiciones limitantes para formarlo, 10 de los 16 experimentos produjeron rendimientos semejantes a los del yoghurt, que suelen ser de 0.5 – 13 mg/Kg (Escamilla *et al.*, 1996b). Al término de la fermentación en estos experimentos pudo percibirse un olor muy leve tipo mantequilla en los caldos, así como una ligera formación de burbujas. El experimento que acumuló más diacetilo tuvo presencia de glucosa y de extracto de levadura, y presentó un contenido final de 8.31 mg/l, que está dentro del rango del observado en los productos lácteos fermentados (2.7 - 18 mg/l) (Escamilla *et al.*, 1996b).

**Cuadro 10**  
**Variables de respuesta para los análisis estadísticos de la**  
**1ª serie de cultivos en almidón. Valores finales - iniciales**

| Exp.<br>No. | Factores  | <i>Pd. pentosaceus</i> |                       | <i>Lb. acidophilus</i> |  |
|-------------|---|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
|             |   | Almidón<br>( g/l )     | Diacetilo<br>( mg/l ) | Almidón<br>( g/l )     | Act.<br>Amil.<br>( U / l ) <sup>a)</sup> |
| 1           | Cit. 0, Temp. 28, Glu. 0, Tr 0,<br>CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.05         | - 7.37                 | 1.31                  | - 1.81                 | 0  |
| 2           | Cit. 0, Temp. 28, Glu. 0, Tr 0<br>CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.2        | - 9.23                 | 4.47                  | - 12.02                | 0  |
| 3           | Cit. 0, Temp. 28, Glu. 1.0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.05     | - 1.90                 | 4.25                  | - 21.38                | 272.8                                    |
| 4           | Cit. 0, Temp. 28, Glu. 1.0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.2   | 1.45                   | 5.89                  | - 26.13                | 2,608.3                                  |
| 5           | Cit. 0, Temp. 35, Glu. 0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.2        | - 13.17                | 2.04                  | - 13.54                | 0  |
| 6           | Cit. 0, Temp. 35, Glu. 0, Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.05    | - 14.50                | 0.32                  | - 1.11                 | 0  |
| 7           | Cit. 0, Temp. 35, Glu. 1.0,<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.2        | - 7.14                 | 2.46                  | - 7.91                 | 6,092.8                                  |
| 8           | Cit. 0, Temp. 35, Glu. 1.0,<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.05    | 2.13                   | 2.13                  | - 2.83                 | 5,620                                    |
| 9           | Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 0<br>Tr 0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.05      | - 9.42                 | 0.86                  | - 0.04                 | 0  |
| 10          | Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 0<br>Tr 0.1, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.2    | -16.69                 | 4.74                  | - 1.98                 | 0  |
| 11          | Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 1.0<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.05      | - 18.39                | 3.23                  | - 26.56                | 1,026.2                                  |
| 12          | Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 1.0<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.2    | -0.29                  | 5.01                  | - 25.39                | 3,230                                    |
| 13          | Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 0,<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.2        | - 17.34                | 1.55                  | - 2.01                 | 0  |
| 14          | Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 0,<br>Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.05    | - 13.74                | 0.77                  | - 1.21                 | 0  |
| 15          | Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 1.0<br>Tr 0.1, CaCO <sub>3</sub> 0, Ex. Lev. 0.2     | - 4.31                 | 7.77                  | - 1.66                 | 385.6                                    |
| 16          | Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 1.0 Tr<br>0.1, CaCO <sub>3</sub> 0.02, Ex. Lev. 0.05 | - 2.97                 | 0.70                  | - 1.89                 | 232.2                                    |

a) U / l: Cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa/min, por cada litro de caldo fermentado y centrifugado; a 37°C, pH= 5.5.

**Cuadro 11**  
**Análisis de varianza y contribución porcentual del consumo de almidón *in situ* en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus* (A.O. L16)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F c/ error<br>Confundido | Significan-<br>cia, factor | Contribu-<br>ción P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 : A=Citrato                        | 1           | 42.801   | 1.552          | 3.070                    |                            |                         |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 7.090    | 0.257          |                          |                            |                         |
| 3 : A x B                            | 1           | 34.021   | 1.234          | 2.440                    |                            |                         |
| 4 : C=Gluc.                          | 1           | 247.913  | 8.990          | 17.780                   | *** Gluc.                  | 75.3                    |
| 5 : A x C                            | 1           | 0.006    | 0.0002         |                          |                            |                         |
| 6 : B x C                            | 1           | 28.732   | 1.042          | 2.061                    |                            |                         |
| 7 : F=Treo.                          | 1           | 7.749    | 0.281          |                          |                            |                         |
| 8 : D=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 20.149   | 0.731          | 1.445                    |                            |                         |
| 9 : A x D                            | 1           | 11.238   | 0.407          | 0.806                    |                            |                         |
| 10 : E=Ex.Lev                        | 1           | 0.031    | 0.001          |                          |                            |                         |
| 11 : error'                          | 1           | 7.381    |                |                          |                            |                         |
| 12 : C x D                           | 1           | 62.660   | 2.272          | 4.494                    | *Glu/ CaCO <sub>3</sub>    | 15.7                    |
| 13: error''                          | 1           | 12.955   |                |                          |                            |                         |
| 14: C x E                            | 1           | 34.566   | 1.253          | 2.479                    |                            |                         |
| 15: error'''                         | 1           | 62.390   |                |                          |                            |                         |
| <b>TOTAL:</b>                        | 15          |          |                |                          |                            | 100                     |
| <b>error directo</b>                 | 3           | 27.575   |                |                          |                            |                         |
| <b>error confundido</b>              | 7           | 13.943   |                |                          |                            |                         |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                          |                            | 91                      |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                          |                            | 9.0                     |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb</sub>\* (1, 7) = 3.59,  $\alpha = 0.1$

F<sub>Tb</sub>\*\* (1, 7) = 5.59,  $\alpha = 0.05$

F<sub>Tb</sub>\*\*\* (1, 7) = 12.20,  $\alpha = 0.01$

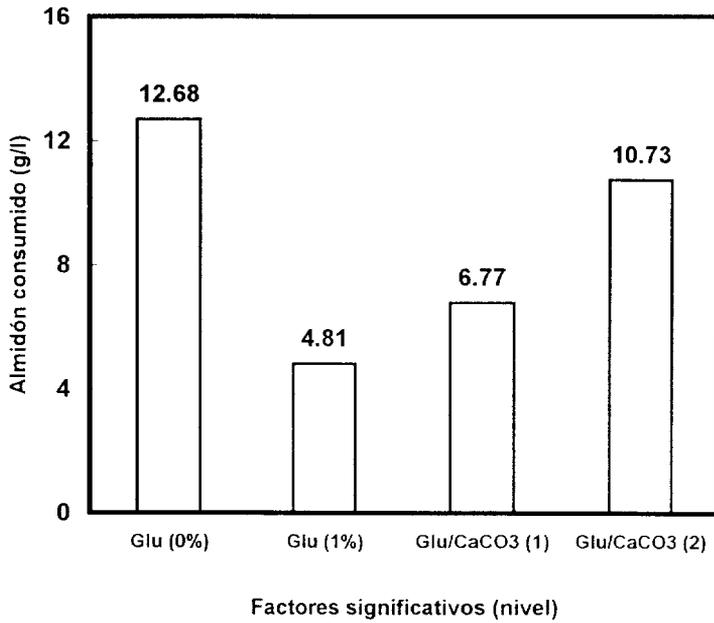


Fig. 8 Factores significativos para el consumo de almidón por *Pd. pentosaceus*. 1ª serie de almidón

**Cuadro 12**  
**Ecuación de estimación de medias del consumo de almidón *in situ***  
**en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus***

| Factores<br>Significativos            | Medias (g/l) |         | g.l.<br>(n-1) | Niveles                                     |
|---------------------------------------|--------------|---------|---------------|---|
|                                       | Nivel 1      | Nivel 2 |               |   |
| C    Glucosa                          | 12.68        | 4.81    |               | N-1: 0 %                                    |
| C x D    Gluc. /<br>CaCO <sub>3</sub> | 6.77         | 10.73   |               | N-2: Glu. 0 % y<br>CaCO <sub>3</sub> 0.02 % |
| Media                                 | 11.70        |         | 1             |   |

*g.l.* = grado de libertad.

$$\mu_{(C_1, C-D_2)} = \bar{C}_1 + \bar{C} - \bar{D}_2 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(C_1, C-D_2)} = 12.68 + 10.73 - 1 (11.70)$$

$$\mu_{(C_1, C-D_2)} = 23.41 - 11.70$$

$$\mu_{(C_1, C-D_2)} = 11.70 \quad \text{Almidón consumido *in situ*, g/l}$$

Para esclarecer cuales fueron los factores que influyeron de manera significativa en la producción de diacetilo (Cuadro 10), se aplicaron el análisis de varianza y el cálculo de contribución porcentual de Taguchi que se muestra en el Cuadro 13. Se observa que el extracto de levadura y la glucosa fueron altamente significativos, y que la temperatura lo fue un poco menos. Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de diacetilo) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 9. El Cuadro 14 indicó que los niveles altos de glucosa y extracto de levadura fueron los más recomendables, mientras que la temperatura baja fue la seleccionada. Adicionalmente, en la ecuación de estimación de medias se calculó la producción de diacetilo teórica que se obtendría en una fermentación con las condiciones recomendadas en este análisis estadístico.

El hecho de que fuera el consumo de glucosa y no el de citrato el que favoreció la acumulación de diacetilo fue sorprendente, pues en investigaciones previas en las que se utilizaron substratos como leche y vinos, el citrato había sido considerado el precursor principal de la biosíntesis del diacetilo por las bacterias lácticas (Cogan, 1995; Cogain *et al.*, 1995; Escamilla *et al.*, 1996a; Margalith, 1981; Marshall, 1987). Una hipótesis que deriva de la observación del presente sistema, consiste en que mientras *Pd. pentosaceus* consumía la glucosa libre rápidamente como fuente de carbono y energía, el almidón que hidrolizó lentamente, funcionaba como una fuente alterna, y tal vez poco regulada de un exceso de piruvato, del cual pudo derivar el diacetilo.

**Cuadro 13**  
**Análisis de varianza de la producción de diacetilo en la 1ª serie de**  
**cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus* (A.O. L16)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F c/ error<br>Confundido | Significan-<br>cia, factor | Contribución P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1 :A= Citrato                        | 1           | 0.188    | 0.055          |                          |                            |                    |
| 2 : B= Temp.                         | 1           | 9.020    | 2.653          | 5.9633                   | ** Temp.                   | 15.1               |
| 3 : A x B                            | 1           | 2.187    | 0.643          |                          |                            |                    |
| 4 : C=Gluc.                          | 1           | 14.788   | 4.349          | 9.776                    | *** Gluc.                  | 26.7               |
| 5 : A x C                            | 1           | 0.306    | 0.090          |                          |                            |                    |
| 6 : B x C                            | 1           | 0.117    | 0.034          |                          |                            |                    |
| 7 : F=Treo.                          | 1           | 1.989    | 0.585          |                          |                            |                    |
| 8 : D=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 0.020    | 0.006          |                          |                            |                    |
| 9 : A x D                            | 1           | 1.527    | 0.4492         |                          |                            |                    |
| 10 : E=Ex Lev                        | 1           | 25.930   | 7.626          | 17.142                   | *** Ex. Lev                | 49.1               |
| 11 : error'                          | 1           | 2.786    |                |                          |                            |                    |
| 12 : CxD                             | 1           | 4.520    | 1.329          | 2.988                    |                            |                    |
| 13: error''                          | 1           | 4.258    |                |                          |                            |                    |
| 14: C x E                            | 1           | 0.102    | 0.030          |                          |                            |                    |
| 15: error'''                         | 1           | 3.157    |                |                          |                            |                    |
| <b>TOTAL:</b>                        | 15          |          |                |                          |                            | 100                |
| <b>error directo</b>                 | 3           | 3.400    |                |                          |                            |                    |
| <b>error confundido</b>              | 11          | 1.513    |                |                          |                            |                    |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                          |                            | 90.9               |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                          |                            | 9.1                |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb\*</sub> (1, 11) = 3.23,  $\alpha = 0.1$ .

F<sub>Tb\*\*</sub> (1, 11) = 4.84,  $\alpha = 0.05$ .

F<sub>Tb\*\*\*</sub> (1, 11) = 9.65,  $\alpha = 0.01$ .

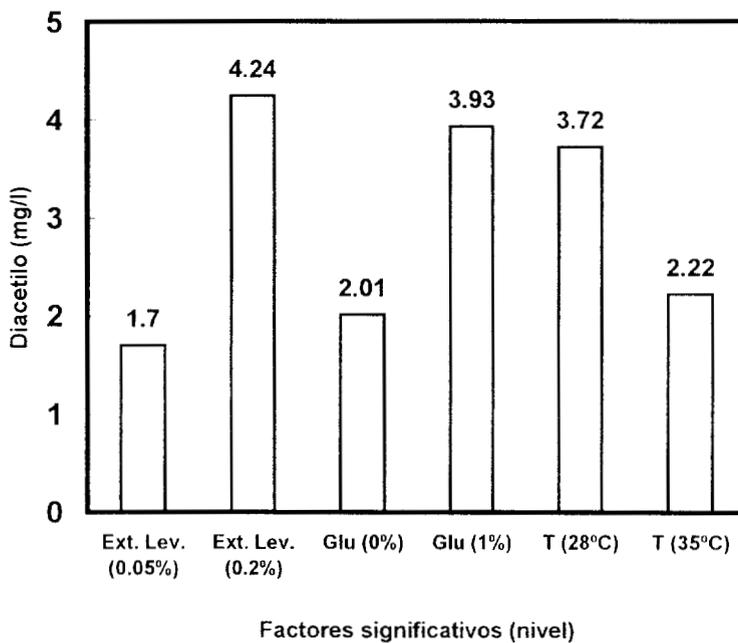


Fig. 9 Factores significativos para la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus*. 1ª serie de almidón

**Cuadro 14**  
**Ecuación de estimación de medias de la producción de diacetilo**  
**en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus***

| Factores<br>Significativos | Medias (mg/l) |         | g.l.<br>(n-1) | Niveles    |
|----------------------------|---------------|---------|---------------|------------|
|                            | Nivel 1       | Nivel 2 |               |            |
| <b>E</b> Ext. Lev.         | 1.70          | 4.24    |               | N-2: 0.2 % |
| <b>C</b> Gluc.             | 2.01          | 3.93    |               | N-2: 1.0 % |
| <b>B</b> Temp.             | 3.72          | 2.22    |               | N-1: 28 °C |
| Media                      | 2.97          |         | 2             |            |

g.l. = grados de libertad

$$\mu_{(E2,C2,B1)} = \bar{E}_2 + \bar{C}_2 + \bar{B}_1 - g.l. (\mu_{Tot})$$

$$\mu_{(E2,C2,B1)} = 4.24 + 3.93 + 3.72 - 2 (2.97)$$

$$\mu_{(E2,C2,B1)} = 11.89 - 5.94$$

$$\mu_{(E2,C2,B1)} = 5.95 \text{ Diacetilo producido, mg/l}$$

Los requerimientos de ciertos factores de crecimiento por las bacterias lácticas para su desarrollo han sido ampliamente publicadas, sin embargo, el efecto de los mismos sobre la formación del diacetilo no se conocía. El análisis estadístico de esta serie de cultivos demostró que el enriquecimiento del medio con el extracto de levadura fue definitivo en la biosíntesis del diacetilo. La temperatura de 28°C seleccionada era la esperada, pues además de coincidir con la óptima de crecimiento de esta cepa, informes previos de cultivos en leche con otras bacterias lácticas, indicaron que las temperaturas bajas fueron preferibles a las altas para la producción de diacetilo (Escamilla *et al.*, 1996a; Klaver *et al.*, 1992; Yadav y Srinivasan, 1985).

*Cultivos con Lb. acidophilus.* Con respecto a los cultivos axénicos con *Lb. acidophilus*, se detectó en ellos un olor con nota ligeramente afrutada, que recordaba al acetato de etilo, pero no se observó evolución de gas. En el Cuadro 15 se presenta un resumen de los análisis químicos realizados en estos cultivos. Los valores de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ , mostraron un error experimental muy bajo.

También con este microorganismo, la presencia de glucosa favoreció la disminución del pH del caldo, particularmente en el experimento que se incubó con extracto de levadura y en ausencia de  $\text{CaCO}_3$ , a 35°C. Esta temperatura corresponde a la óptima de crecimiento de la cepa (Kandler y Weiss, 1986).

**Cuadro 15**  
**Resumen de los datos analíticos de la 1ª serie de**  
**cultivos en almidón con *Lb. acidophilus***

| Parámetros analizados                          | Iniciales<br>( Mín. / Máx. ) | Finales<br>( Mín. / Máx. ) | C. V. <sup>c)</sup><br>( % ) | Mayor cambio <sup>d)</sup> |   |
|--|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|---|
|  |                              |                            |                              | valor<br>(Fin. - Ini)      | # Exp.  |
| pH   | 6.33 6.96                    | 4.85 6.76                  | 0.87                         | - 1.68                     | 7<br>Cit. 0, Temp. 35, Glu. 1.0, Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.2      |
| Ac. cítrico (g/l)                              | 0 0.96                       | 0.83 0.91                  | 4.68                         | - 0.06                     | 13<br>Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 0, Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.2     |
| Ac. láctico (g/l)                              | 0 0.93                       | 0.02 3.54                  | 6.64                         | 2.61                       | 15<br>Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 1.0, Tr 0.1, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.2 |
| Carb. Tot. (g/l)                               | 23.42 56.56                  | 21.44 51.85                | 2.40                         | - 27.00                    | 11<br>Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 1.0, Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.05  |
| Azúc. Red. g/l)                                | 0 6.77                       | 0.56 6.20                  | 2.40                         | - 0.75                     | 15<br>Cit. 0.1, Temp. 35, Glu. 1.0, Tr 0.1, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.2 |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)                    | 23.42 51.44                  | 21.44 45.79                | --                           | - 26.56                    | 11<br>Cit. 0.1, Temp. 28, Glu. 1.0, Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0<br>Ex. Lev 0.05   |
| Activ. Amilol. Extracel. (U / l) <sup>b)</sup> | 0 4,511.39                   | 0 10,076.67                | 6.79                         | 6,092.78                   | 7<br>Cit. 0, Temp. 35, Glu. 1.0, Tr 0, CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Ex. Lev 0.2      |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red. en c/ experimento.

b) U / l: Cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa/min, por cada litro de caldo fermentado y centrifugado; a 37°C, pH= 5.5.

c) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro. Cada experimento inicial o final se calculó por: C. V.= (Desv. Est./Prom.) • 100.

d) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie después de la fermentación

El ácido cítrico fue metabolizado ligeramente por *Lb. acidophilus* solamente para crecimiento microbiano, puesto que no se presentó la formación del diacetilo, a pesar de que en pruebas cualitativas preliminares la bacteria había mostrado una ligera generación del volátil en medio de almidón. Del mismo modo, se ha observado el consumo del ácido sin formar aromas por otras bacterias lácticas (Cogan *et al.*, 1989; Escamilla *et al.*, 1996a). Se observó que tanto el extracto de levadura, como la temperatura de 35°C, incrementaron el consumo de ácido cítrico. Entre todos los cultivos, la mayor disminución de citrato se presentó en el experimento que además de lo ya indicado, no tenía ni glucosa ni CaCO<sub>3</sub>.

La producción de ácido láctico por *Lb. acidophilus* se favoreció por los niveles altos de glucosa, extracto de levadura, citrato y T: 35°C. *Lb. acidophilus* produjo mayor cantidad de ácido láctico que *Pd. pentosaceus*.

En todas las fermentaciones con *Lb. acidophilus* se presentó consumo de carbohidratos totales; en varias de ellas el consumo fue mayor al observado en los cultivos con *Pd. pentosaceus*. Los mayores cambios con el bacilo se presentaron cuando se añadió glucosa inicialmente y se usó una temperatura de 28°C.

En ningún caso se observó acumulación de azúcares reductores al final de la fermentación; por lo que se consideró que los carbohidratos simples generados por la hidrólisis del almidón, fueron consumidos inmediatamente. El experimento que tuvo la disminución más notable de la serie se incubó a 35°C y tenía los niveles altos de glucosa y extracto de levadura.

Los valores calculados de almidón indicaron que *Lb. acidophilus* hidrolizó y consumió almidón para su reproducción *in situ* en todos los experimentos. Estos cambios de concentración de almidón (Cuadro 10) fueron generalmente mayores que los observados con *Pd. pentosaceus*. Los experimentos que presentaron un alto consumo de carbohidratos totales tuvieron un alto consumo de almidón (carbohidratos no reductores), lo que corrobora la capacidad hidrolítica de esta cepa. Se aplicó un análisis estadístico de Taguchi al consumo de almidón *in situ*; el análisis de varianza y el cálculo de contribuciones porcentuales (Cuadro 16) mostraron que la influencia de la glucosa y de la temperatura fueron tan fuertes, que aún su interacción fue significativa. Otro factor importante, aunque en menor grado, fue el extracto de levadura. Los valores promedio de la variable de respuesta (consumo de almidón) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 10. El Cuadro 17 presenta la selección de los mejores niveles: temperatura de 28°C, y los niveles altos de glucosa (1%) y extracto de levadura (0.2%). La ecuación de estimación de medias calculada con esos resultados indica la concentración teórica de diacetilo que se obtendría si se realizara un cultivo con las condiciones seleccionadas.

**Cuadro 16**  
**Análisis de varianza del consumo de almidón *in situ* en la 1ª serie**  
**de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus* (A.O. L16)**

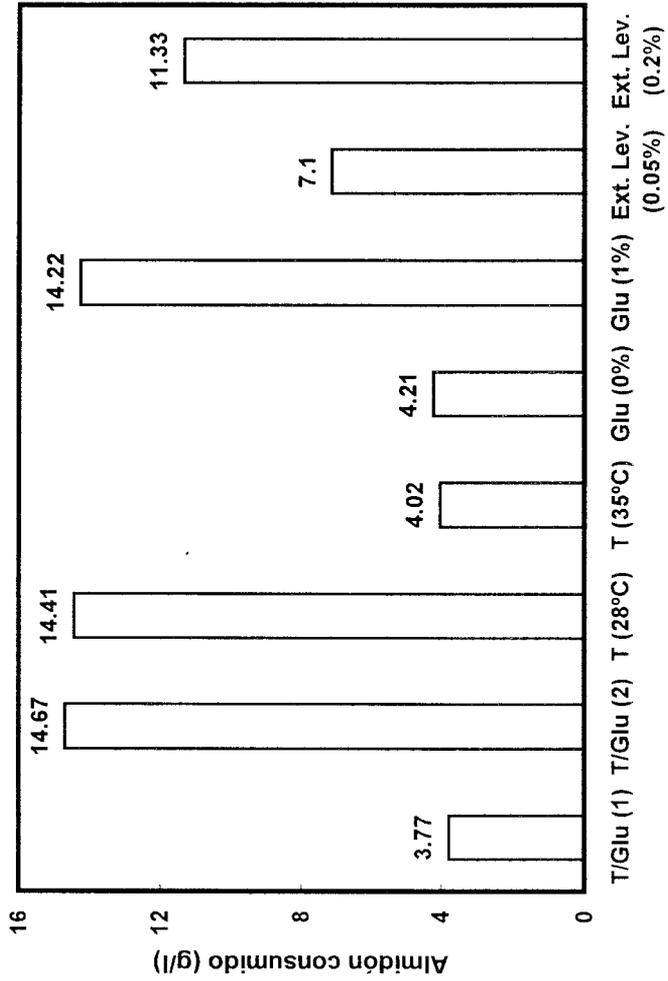
| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F c/ error<br>confundido | Significan-<br>cia y factor | Contribución, P(%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 : A=Citrato                        | 1           | 42.211   | 1.910          | 0.697                    |                             |                    |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 432.182  | 19.553         | 35.327                   | ***Temp.                    | 30.5               |
| 3 : A x B                            | 1           | 7.904    | 0.358          |                          |                             |                    |
| 4 : C=Gluc.                          | 1           | 400.480  | 18.119         | 35.327                   | ***Gluc.                    | 28.2               |
| 5 : A x C                            | 1           | 26.260   | 1.188          | 2.316                    |                             |                    |
| 6 : B x C                            | 1           | 475.262  | 21.502         | 41.924                   | ***T xGlu.                  | 33.6               |
| 7 : F=Treon.                         | 1           | 9.036    | 0.409          |                          |                             |                    |
| 8 : D=CaCo <sub>3</sub>              | 1           | 0.334    | 0.015          |                          |                             |                    |
| 9 : A x D                            | 1           | 0.471    | 0.021          |                          |                             |                    |
| 10 : E=Ex Lev.                       | 1           | 71.428   | 3.23           | 6.301                    | **Ex. Lev.                  | 4.4                |
| 11 : error'                          | 1           | 60.606   |                |                          |                             |                    |
| 12 : CxD                             | 1           | 0.002    | 0.0001         |                          |                             |                    |
| 13: error''                          | 1           | 0.988    |                |                          |                             |                    |
| 14: C x E                            | 1           | 17.969   | 0.813          |                          |                             |                    |
| 15: error'''                         | 1           | 4.715    |                |                          |                             |                    |
| <b>TOTAL:</b>                        | 15          |          |                |                          |                             | 100                |
| error directo                        | 3           | 22.103   |                |                          |                             |                    |
| error confundido                     | 9           | 11.336   |                |                          |                             |                    |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                          |                             | 96.7               |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                          |                             | 3.3                |

*g.l.* = grados de libertad

FTb\* (1,9) = 3.36,  $\alpha = 0.1$ .

FTb\*\* (1,9) = 5.12,  $\alpha = 0.05$ .

FTb\*\*\* (1,9) = 10.60,  $\alpha = 0.01$ .



Factores significativos (nivel)

Fig. 10 Factores significativos para el consumo de almidón por *Lb. acidophilus*. 1ª serie de almidón

**Cuadro 17**  
**Ecuación de estimación de medias del consumo de almidón *in situ***  
**en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus***

| Factores<br>Significativos | Medias ( g/l ) |         | g.l.<br>(n-1) | Niveles            |
|----------------------------|----------------|---------|---------------|--------------------|
|                            | Nivel 1        | Nivel 2 |               |                    |
| <b>B x C</b> T / Gluc.     | 3.77           | 14.67   |               | N-2:T 28°C, Glu 1% |
| <b>B</b> Temp.             | 14.41          | 4.02    |               | N-1: 28 °C         |
| <b>C</b> Glucosa           | 4.21           | 14.22   |               | N-2: 1 %           |
| <b>E</b> Ext. Lev.         | 7.10           | 11.33   |               | N-2: 0.2 %         |
| <b>Media</b>               | 13.66          |         | 3             |                    |

*g.l.* = grados de libertad

$$\mu_{(B-C2, B1, C2, E2)} = B - \bar{C}_2 + \bar{B}_1 + \bar{C}_2 + \bar{E}_2 - g.l.(\mu_{Tot})$$

$$\mu_{(B-C2, B1, C2, E2)} = 14.67 + 14.41 + 14.22 + 11.33 - 3(13.66)$$

$$\mu_{(B-C2, B1, C2, E2)} = 54.63 - 40.97$$

$$\mu_{(B-C2, B1, C2, E2)} = 13.66 \quad \text{Almidón consumido} \\ \text{in situ, g/l}$$

Con excepción del nivel de temperatura, no es sorprendente que los otros dos factores intervengan activamente en el desarrollo de *Lb. acidophilus*. Puede considerarse que el nivel alto de temperatura (35°C), por ser el óptimo para el desarrollo esta cepa, favoreció el consumo directo de la glucosa para formar ácido láctico y disminuir el pH; pero aún no hay evidencias que aclaren por qué esa temperatura no fue también la mejor para el consumo de almidón *in situ*, ya que los estudios de Li y Chan (1983) indicaron que la amilasa extracelular de una cepa de *Lb. acidophilus* tenía una temperatura óptima de 37°C, en ensayos realizados *in vitro*.

También se evaluó la influencia de los factores de fermentación en la amilasa extracelular de *Lb. acidophilus*, determinando su actividad en un ensayo realizado *in vitro* para evitar la interferencia de las células. Se utilizó el caldo centrifugado de los cultivos como fuente de la enzima no purificada. Los resultados indicaron que solamente los sobrenadantes de los cultivos adicionados con glucosa inicialmente presentaron actividad amilolítica. En cualquiera de esos casos, las actividades fueron relativamente bajas si se comparan con las presentadas por hongos o bacterias de otros géneros. La muestra que presentó la mayor actividad amilolítica en este ensayo, provino de un cultivo con glucosa y extracto de levadura, sin citrato e incubado a 35°C.

La variable de respuesta considerada aquí fue el cambio de actividad amilolítica extracelular por efecto de la fermentación (Cuadro 10). Se realizó un análisis estadístico de acuerdo a la metodología de Taguchi. El análisis de varianza y el de contribución porcentual (Cuadro 18) señalaron a la glucosa, al citrato y a la treonina como los factores más significativos. La interacción del citrato con la temperatura tuvo un efecto ligeramente superior a la que ejerció el citrato sólo, mientras que la interacción de este factor con la glucosa tuvo el mismo nivel de significancia que el citrato solo. El extracto de levadura no afectó significativamente, mientras que la glucosa mostró una contribución porcentual mucho más elevada que cualquier otro factor. Los valores promedio de la variable de respuesta (cambio en la actividad amilolítica) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 11. En el Cuadro 19 se seleccionaron las mejores condiciones para incrementar la actividad amilolítica extracelular de *Lb. acidophilus*, que fueron: la presencia de glucosa, la ausencia de citrato y de treonina y la temperatura de 35°C en interacción con la ausencia de citrato.. A partir de la ecuación de estimación de medias se determinó el cambio de actividad amilolítica predicha, cuando se utilizan las condiciones de cultivo seleccionadas. Es posible que la adición de ácido cítrico y de treonina orientan hacia rutas metabólicas distintas a las de utilización de carbohidratos.

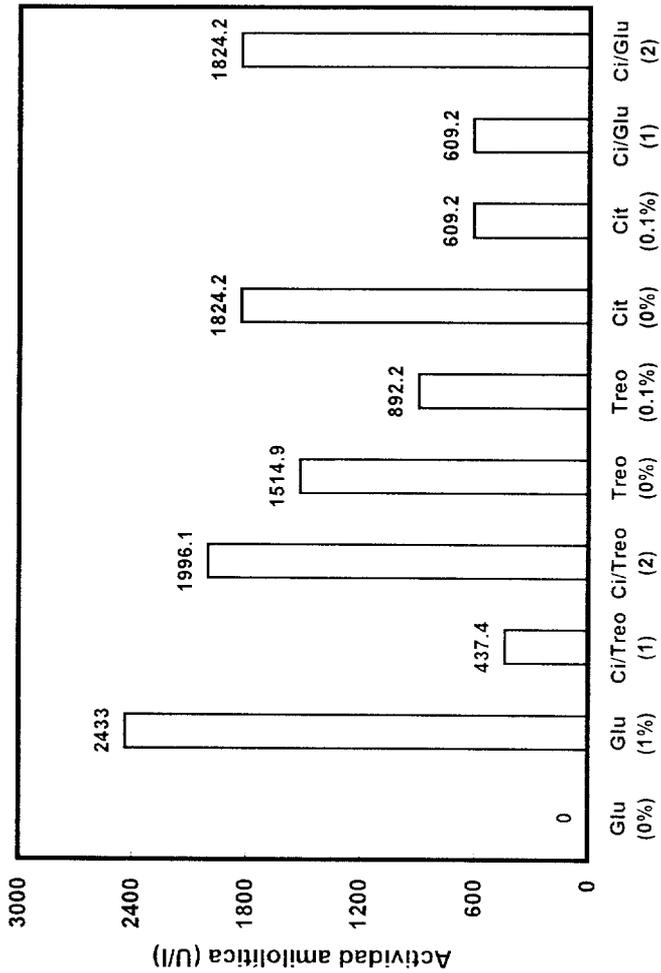
**Cuadro 18**  
**Análisis de varianza del cambio de actividad amilolítica extracelular**  
**en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus* (A.O. L16)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza              | F<br>calculada        | F c/ error<br>confundido | Significan-<br>cia, factor | Contribu-<br>ción P (%) |
|--------------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 : A=Citrato                        | 1           | 5.91 x10 <sup>6</sup> | 1.98 x10 <sup>8</sup> | 6.826                    | **Citrato                  | 9.2                     |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 1.69 x10 <sup>6</sup> | 5.64 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 3 : A x B                            | 1           | 9.72 x10 <sup>6</sup> | 3.25 x10 <sup>8</sup> | 11.235                   | ***Citr x T                | 16.1                    |
| 4 : C=Gluc.                          | 1           | 2.37 x10 <sup>7</sup> | 7.93 x10 <sup>8</sup> | 27.383                   | ***Gluc.                   | 41.5                    |
| 5 : A x C                            | 1           | 5.91 x10 <sup>6</sup> | 1.98 x10 <sup>8</sup> | 6.826                    | **Citr x Glu               | 9.2                     |
| 6 : B x C                            | 1           | 1.69 x10 <sup>6</sup> | 5.64 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 7 : F=Treon                          | 1           | 9.72 x10 <sup>6</sup> | 3.25 x10 <sup>8</sup> | 11.235                   | ***Treon.                  | 16.1                    |
| 8 : D=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 9.57 x10 <sup>5</sup> | 3.20 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 9 : A x D                            | 1           | 2.20 x10 <sup>3</sup> | 7.37 x10 <sup>4</sup> |                          |                            |                         |
| 10 : E=Ex Lev                        | 1           | 1.67 x10 <sup>6</sup> | 5.58 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 11 : error'                          | 1           | 1.27 x10 <sup>4</sup> |                       |                          |                            |                         |
| 12 : CxD                             | 1           | 9.57 x10 <sup>5</sup> | 3.20 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 13: error''                          | 1           | 2.20 x10 <sup>3</sup> |                       |                          |                            |                         |
| 14: C x E                            | 1           | 1.67 x10 <sup>6</sup> | 5.58 x10 <sup>7</sup> |                          |                            |                         |
| 15: error'''                         | 1           | 1.27 x10 <sup>4</sup> |                       |                          |                            |                         |
| <b>TOTAL:</b>                        | 15          |                       |                       |                          |                            | 100                     |
| <b>error directo</b>                 | 3           | 9.22 x10 <sup>3</sup> |                       |                          |                            |                         |
| <b>error confundido</b>              | 10          | 8.65 x10 <sup>5</sup> |                       |                          |                            |                         |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |                       |                       |                          |                            | 92.1                    |
| <b>P residual</b>                    |             |                       |                       |                          |                            | 7.9                     |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb</sub>\*\* (1,10) = 4.96, α = 0.05.

F<sub>Tb</sub>\*\*\* (1,10) = 10.00, α = 0.01.



Factores significativos (nivel)

Fig. 11 Factores significativos para el cambio de actividad amilolítica por *Lb. acidophilus*. 1ª serie de almidón

**Cuadro 19**  
**Ecuación de estimación de medias del cambio de actividad amilolítica extracelular en la 1ª serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus***

| Factores<br>Significativos | Medias ( U / l ) |         | g.l.<br>(n-1) | Niveles              |
|----------------------------|------------------|---------|---------------|----------------------|
|                            | Nivel 1          | Nivel 2 |               |                      |
| C Glucosa                  | 0                | 2433.49 |               | N-2: 1 %             |
| A x B Citr. / T            | 437.36           | 1996.13 |               | N-2: Citr 0%, T 35°C |
| F Treonina                 | 1514.92          | 892.17  |               | N-1: 0 %             |
| A Citrato                  | 1824.24          | 609.25  |               | N-1: 0 %             |
| A x C Citr / Gluc          | 609.25           | 1824.24 |               | N-2: Citr 0%, Glu 1% |
| Media                      | 1214.10          |         |               | 4                    |

g.l. = grados de libertad

$$\mu_{(A1, C2, F1, A-B2, A-C2)} = \bar{A}_1 + \bar{C}_2 + \bar{F}_1 + \bar{A}-\bar{B}_2 + \bar{A}-\bar{C}_2 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(A1, C2, F1, A-B2, A-C2)} = (1824 + 2434 + 1515 + 1996 + 1824) - 4 (1214)$$

$$\mu_{(A1, C2, F1, A-B2, A-C2)} = 9593 - 4856$$

$$\mu_{(A1, C2, F1, A-B2, A-C2)} = 4737 \quad \text{U / l de amilasa extracelular}$$

*Conclusiones.* El análisis estadístico de Taguchi aplicado en la 1ª serie de almidón se resume en el Cuadro 20. En base a estos resultados, se puede concluir que la presencia de glucosa favoreció a *Pd. pentosaceus* para producir diacetilo, y en el caso de *Lb. acidophilus*, favoreció la actividad amilolítica y el consumo de almidón. Sin embargo, la glucosa ejerció un efecto negativo en el consumo de almidón por *Pd. pentosaceus*. La presencia del extracto de levadura fue importante para la formación de diacetilo por *Pd. pentosaceus* y para el consumo de almidón *in situ* por *Lb. acidophilus*, pero no favoreció la actividad de la enzima extracelular del bacilo. La temperatura de 28°C orientó a una mayor producción de diacetilo en el pediococo, y a un mejor consumo de almidón por el lactobacilo. La adición de citrato y la treonina afectó negativamente la actividad amilolítica extracelular de *Lb. acidophilus*, por lo que se consideró conveniente no utilizar esos compuestos en las series posteriores. Por otro lado, el nivel alto de temperatura (35°C) incrementó el consumo de glucosa de *Lb. acidophilus* con la subsecuente producción de ácido láctico, y también favoreció la producción de amilasas extracelulares, pero no el consumo de almidón *in situ*. Como la temperatura influyó de distinta manera en las variables de respuesta estudiadas, era necesario evaluarla de nuevo en una segunda serie de cultivos axénicos, pero disminuyendo los efectos de otros factores que podrían interferir. Tampoco el efecto de la adición de CaCO<sub>3</sub> fue muy claro, pues solo apareció en la interacción con la glucosa para el consumo de almidón por *Pd. pentosaceus*, por lo que se decidió evaluar de nuevo este factor en la siguiente serie, pero usando una concentración más alta.

**Cuadro 20**  
**Resumen del análisis estadístico de la 1ª serie de cultivos en almidón**

| Factores e interacciones significativas | Niveles seleccionados <sup>(a)</sup> <sup>(b)</sup> para        |  |   |   |
|---|---|--|---|---|
|   | <i>Pd. pentosaceus</i>  |  | <i>Lb. acidophilus</i>  |   |
|   | Consumo de almidón <i>in situ</i> ,<br>11.70 g/l <sup>(c)</sup> | Producción de diacetilo,<br>5.95 mg/l <sup>(c)</sup> | Consumo de almidón <i>in situ</i> ,<br>13.66 g/l <sup>(c)</sup> | Cambio Activ. amilolítica,<br>4737 U/l <sup>(c)</sup> |
| Glucosa ( % )                           | 0 (75.3) ***  | 1 (26.7) ***   | 1 (28.2) ***  | 1 (41.5) ***  |
| Temp. (°C)                              | -   | 28 (15.1) **   | 28 (30.5) ***   | -   |
| Ext. Lev. ( % )                         | -   | 0.2 (49.1) ***                                       | 0.2 (4.4) **  | -   |
| Citrato ( % )                           | -   | -  | -   | 0 (9.2) **  |
| Treonina ( % )                          | -   | -  | -   | 0 (16.1) ***  |
| Tem./Glu (°C,%)                         | -   | -  | 28 / 1 (33.6) ***   | -   |
| Tem./Citr (°C,%)                        | -   | -  | -   | 35 / 0 (16.1) ***                                     |
| Glu/CaCO <sub>3</sub> (%, %)            | 0 / 0.02 (15.7) *   | -  | -   | -   |
| Citr./Glu. (%, %)                       | -   | -  | -   | 0 / 1 (9.2) **  |

a) Contribuciones porcentuales al efecto total, %.

b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01.

c) Valores teóricos calculados con las ecuaciones de estimación de medias.

El hecho de que las condiciones que favorecían el consumo de almidón por *Lb. acidophilus* fueran diferentes a las que favorecían su actividad amilolítica extracelular, dio origen al estudio de localización de las amilasas en distintas fracciones celulares que se presenta al final de este trabajo, para determinar si había producción de otras amilasas. También se llevó a cabo ese estudio para justificar la capacidad de utilización de almidón por *Pd. pentosaceus*, cepa que no produce amilasas extracelulares.

## 2ª SERIE.

Esta serie fue realizada con la mayoría de las condiciones de cultivo seleccionadas en la primera, pero evaluando los dos factores cuyo nivel óptimo no había sido definido aún. Los cultivos se realizaron en medio de almidón (medio basal, g/l de H<sub>2</sub>O destilada: almidón soluble, 10; glucosa, 10; peptona de caseína, 2; extracto de levadura, 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.1 y solución de vitaminas y minerales, 5 ml.; pH = 6.5). Los factores evaluados fueron: **Factor A: CaCO<sub>3</sub> (0.01 y 0.03%); y Factor B: temperatura (28 y 35°C).** Se realizaron cultivos axénicos para cada cepa con el diseño del A.O. L8 de Taguchi (Ross, 1989) que se observa en el Cuadro 3. Cuando se evalúa un sistema con dos factores y una interacción como el presente, Taguchi recomienda la utilización del arreglo ortogonal L8 (desglosando las réplicas de los experimentos), en lugar del L4 (promediando los resultados); pues sin realizar más experimentos, se logra incrementar la sensibilidad del tratamiento estadístico, al asignar 4 grados de libertad a la varianza del error. Las variables de respuesta en esta serie fueron: el consumo de

almidón para ambas cepas, la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus* y la producción de amilasa extracelular por *Lb. acidophilus*. A partir de esta serie, todos los cultivos fueron realizados por duplicado. La dispersión de los datos (error experimental) se presenta de manera resumida en cada parámetro con los valores promedio de los coeficientes de variación ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ).

*Cultivos con Pd. pentosaceus.* Un resumen de los parámetros analizados en los cultivos de *Pd. pentosaceus* en la 2ª serie se presenta en el Cuadro 21, en donde se observan valores de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$  aceptables ( $< 10$ ) en todos los parámetros. La producción de lactato no fue muy elevada y su mayor producción se observó en el experimento con  $\text{CaCO}_3$ : 0.03% y T: 35°C; sin embargo, estas condiciones no fueron las mejores para la disminución de pH, que se observó con  $\text{CaCO}_3$ : 0.01% y T: 35°C. Estos resultados indican que el efecto regulador que brindó el nivel alto de  $\text{CaCO}_3$  previno que el cultivo se inhibiera rápidamente por la caída del pH. Por otro lado, los consumos de carbohidratos (totales, reductores y almidón) se vieron más favorecidos al tener los dos factores en sus niveles bajos:  $\text{CaCO}_3$ , 0.01% y T, 28°C; ya que al término de la fermentación en estas condiciones los cultivos tuvieron contenidos de carbohidratos residuales aproximadamente de un 50% de los iniciales.

**Cuadro 21**  
**Resumen de los datos analíticos de la 2ª serie de cultivos**  
**en almidón con *Pd. pentosaceus***

| Parámetros analizados          | Iniciales<br>( Mín. / Máx. ) | Finales<br>( Mín. / Máx. ) | C.V. <sup>c)</sup><br>( % ) | Mayor cambio <sup>d)</sup> |                                      |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
|                                |                              |                            |                             | valor<br>(Fin-Ini)         | # Exp. Factor                        |
| pH                             | 6.29 6.30                    | 4.24 4.90                  | 0.94                        | - 2.04                     | 2 CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 35   |
| Ac. láctico (g/l)              | 0.74 0.83                    | 0.75 2.13                  | 1.41                        | 1.30                       | 4 CaCO <sub>3</sub> 0.03,<br>Temp 35 |
| Carb. Tot. (g/l)               | 18.02                        | 8.85 10.58                 | 3.74                        | - 9.17                     | 1 CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28   |
| Azúc. Red. (g/l)               | 4.69                         | 1.73 1.86                  | 4.90                        | - 2.96                     | 1 CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28   |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)    | 13.33                        | 6.77 8.74                  | --                          | - 6.56                     | 1 CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28   |
| Diacetilo <sup>b)</sup> (mg/l) | 36.65                        | 42.74 98.91                | 9.53                        | 63.27                      | 3 CaCO <sub>3</sub> 0.03,<br>Temp 28 |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red. en c / experimento

b) Determinado por cromatografía gas / líquido

c) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro. Cada experimento inicial o final se calculó por: C. V.= (Desv. Est./Prom.) • 100.

d) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie, después de la fermentación

Para determinar si hubo un efecto significativo de los factores en el consumo de almidón por este microorganismo, se aplicó un análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989). La variable de respuesta en este caso (consumo de almidón) se muestra en el Cuadro 22. El análisis de varianza del Cuadro 23 confirmó que el consumo de almidón por *Pd. pentosaceus*, no se vio influenciado significativamente ( $P > 0.1$ ) por los factores estudiados.

En esta serie, el diacetilo se determinó tanto por el método fotocolorimétrico, como por el de cromatografía gas - líquido (C.G.L.) y como el coeficiente de variación con el segundo método fue sensiblemente menor (Cuadros 21), se seleccionó éste último. La producción de diacetilo mejoró notablemente en esta serie de experimentos, pues se presentaron contenidos cercanos a los 100 mg/l, que equivalen a cinco veces el observado en el queso cottage (Dacremont y Vickers, 1994; Escamilla *et al.*, 1996b). El experimento que formó más diacetilo fue el que tenía  $\text{CaCO}_3$ : 0.03% y T: 28°C. Los valores de producción de diacetilo que constituyeron la variable de respuesta para el análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989), se presentan en el Cuadro 22. Estos valores resultaron notablemente diferentes entre experimentos debido al marcado efecto de los factores.

**Cuadro 22**  
**Variables de respuesta para los análisis estadísticos de la**  
**2ª serie de cultivos en almidón. Valores finales - iniciales**

| Exp.<br>No. | Factor                           | <i>Pd. pentosaceus</i> |                       | <i>Lb. acidophilus</i> |  |
|-------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
|             |                                  | Almidón<br>( g/l )     | Diacetilo<br>( mg/l ) | Almidón<br>( g/l )     | Act. Amil.<br>Extracel.<br>( U / l ) <sup>a)</sup> |
| 1           | CaCO <sub>3</sub> 0, Temp. 28    | - 7.61                 | 62.11                 | - 4.27                 | 0  |
| 1'          | CaCO <sub>3</sub> 0, Temp. 28    | - 5.50                 | 52.01                 | - 3.53                 | 0  |
| 2           | CaCO <sub>3</sub> 0, Temp. 35    | - 4.96                 | 10.28                 | - 2.72                 | 1,073.7  |
| 2'          | CaCO <sub>3</sub> 0, Temp. 35    | - 4.52                 | 3.91                  | - 3.86                 | 1,177.3  |
| 3           | CaCO <sub>3</sub> 0.03, Temp. 28 | - 4.78                 | 60.17                 | - 4.14                 | 0  |
| 3'          | CaCO <sub>3</sub> 0.03, Temp. 28 | - 5.38                 | 66.37                 | - 5.18                 | 0  |
| 4           | CaCO <sub>3</sub> 0.03, Temp. 35 | - 4.61                 | 42.33                 | - 5.42                 | 1,433.4  |
| 4'          | CaCO <sub>3</sub> 0.03, Temp. 35 | - 4.57                 | 42.33                 | - 4.54                 | 1,520.3  |

a) U / l: Cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa/min, por cada litro de caldo fermentado y centrifugado; a 37°C, pH= 5.5.

Cuadro 23

Análisis de varianza del consumo de almidón *in situ* en la 2ª serie de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus* (A.O. L8)

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F c/ error<br>confundido | Significancia,<br>factor |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 : A=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 1.335    | 2.144          | 1.981                    | No son<br>significativos |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 2.653    | 4.262          | 3.938                    |                          |
| 3 : A x B                            | 1           | 0.879    | 1.412          |                          |                          |
| 4 : error'                           | 1           | 0.494    | 0.794          |                          |                          |
| 5 : error''                          | 1           | 1.1970   | 1.923          |                          |                          |
| 6 : error'''                         | 1           | 0.131    | 0.211          |                          |                          |
| 7 : error''''                        | 1           | 0.668    | 1.072          |                          |                          |
| TOTAL:                               | 7           |          |                |                          |                          |
| error directo                        | 4           | 0.623    |                |                          |                          |
| error confundido                     | 5           | 0.674    |                |                          |                          |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb</sub>\* (1, 5) = 4.06,  $\alpha = 0.1$

El análisis de varianza y el cálculo de contribución porcentual mostrados en el Cuadro 24 indicaron que tanto el  $\text{CaCO}_3$ , como la temperatura fueron fuertemente significativos para la producción de diacetilo. Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de diacetilo) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 12. La máxima producción de diacetilo se obtuvo con  $28^\circ\text{C}$  y  $\text{CaCO}_3$ : 0.03%, de acuerdo a los datos indicados en el Cuadro 25. Aplicando los valores de diacetilo producido en esos niveles a la ecuación de estimación de medias, se obtuvo el valor estimado de producción de diacetilo.

**Cuadro 24**  
**Análisis de varianza de la producción de diacetilo en la 2ª serie**  
**de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus* (A.O. L8)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | Significan-<br>cia, factor | Contribución P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|----------------------------|--------------------|
| 1 : A=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 858.879  | 37.969         | ***CaCO <sub>3</sub>       | 20.20              |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 2513.436 | 111.113        | ***Temp.                   | 63.9               |
| 3 : A x B                            | 1           | 421.439  | 18.631         | **CaCO <sub>3</sub> / T    | 8.7                |
| 4 : error                            | 1           | 13.180   | 0.583          |                            |                    |
| 5 : error                            | 1           | 64.214   | 2.839          |                            |                    |
| 6 : error                            | 1           | 0.760    | 0.034          |                            |                    |
| 7 : error                            | 1           | 12.328   | 0.545          |                            |                    |
| <b>TOTAL:</b>                        | 7           | 554.891  |                |                            | 100                |
| error directo                        | 4           | 22.620   |                |                            |                    |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                            | 92.8               |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                            | 7.2                |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb</sub>\*\* (1/4) = 7.71,  $\alpha = 0.05$ .

F<sub>Tb</sub>\*\*\* (1/4) = 21.20,  $\alpha = 0.01$ .

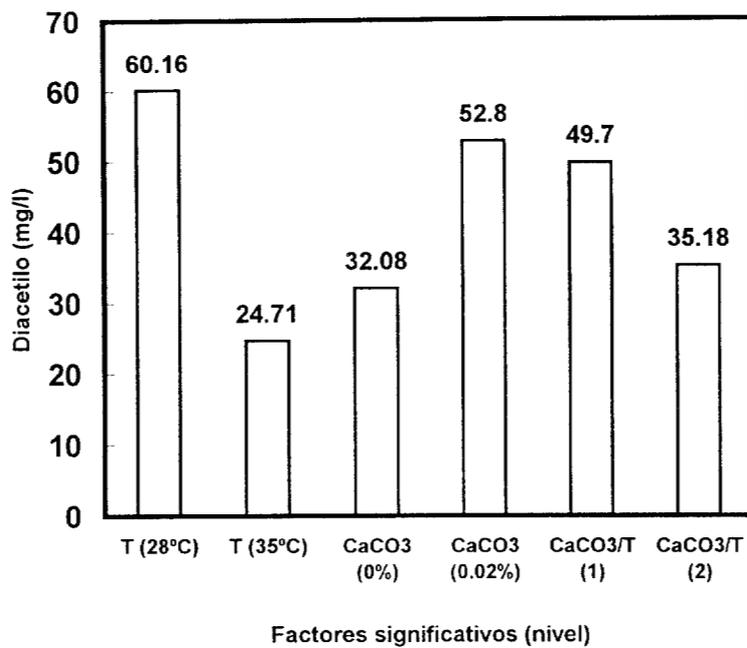


Fig. 12 Factores significativos para la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus*. 2ª serie de almidón

**Cuadro 25**  
**Ecuación de estimación de medias de la producción de diacetilo**  
**en la 2ª serie de cultivos en almidón con *Pd. pentosaceus***

| Factores<br>Significativos         | Medias (mg/l) |         | g.l.<br>(n-1) | Niveles             |
|------------------------------------|---------------|---------|---------------|---------------------|
|                                    | Nivel 1       | Nivel 2 |               |                     |
| <b>B</b> Temp.                     | 60.16         | 24.71   |               | N-1: 28 °C          |
| <b>A</b> CaCO <sub>3</sub>         | 32.08         | 52.80   |               | N-2: 0.03 %         |
| <b>A X B</b> CaCO <sub>3</sub> / T | 49.70         | 35.18   |               | N-1: 28 °C x 0.01 % |
| Media                              | 42.44         |         | 2             |                     |

g.l. = grados de libertad

$$\mu_{(A_2, B_1, A-B_1)} = \bar{A}_2 + \bar{B}_1 + \bar{A} - \bar{B}_1 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(A_2, B_1, A-B_1)} = 52.80 + 60.16 + 49.70 - 2 (42.44)$$

$$\mu_{(A_2, B_1, A-B_1)} = 162.66 - 84.88$$

$$\mu_{(A_2, B_1, A-B_1)} = 77.78 \text{ Diacetilo producido, mg/l}$$

*Cultivos con Lb. acidophilus.* En el Cuadro 26 se presenta un resumen de los resultados analíticos de los cultivos con *Lb. acidophilus*. Los bajos niveles de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$  indican que el error experimental fue aceptable. La mayoría de los parámetros evaluados mostraron cambios similares entre experimentos, con excepción de la actividad amilolítica, que varió notablemente. Como la producción de ácido láctico fue intensa, la disminución del pH también lo fue, sobre todo en el experimento que se consumió más almidón durante la fermentación, que fue el cultivo realizado a 28°C y CaCO<sub>3</sub> de 0.01%. Para determinar si los factores evaluados influyeron en el consumo de almidón (Cuadro 14) se aplicó el análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989).

El análisis de varianza y el cálculo de la contribución porcentual del Cuadro 27 mostraron que solamente la presencia de CaCO<sub>3</sub> influyó significativamente. Los valores promedio de la variable de respuesta (consumo de almidón) calculados con los resultados de los experimentos de los niveles de este factor significativo se muestran en la Fig. 13. Los datos del Cuadro 28 permitieron seleccionar el mejor nivel de este factor, que fue de 0.03%, y la ecuación de estimación de medias indicó el promedio del almidón consumido en los experimentos con el nivel seleccionado.

**Cuadro 26**  
**Resumen de los datos analíticos de la 2ª serie de**  
**cultivos en almidón con *Lb. acidophilus***

| Parámetros<br>analizados                      | Iniciales     |       | Finales         |          | C. V. <sup>c)</sup><br>( % ) | Mayor cambio |        |                                     |
|---|---------------|-------|-----------------|----------|------------------------------|--------------|--------|-------------------------------------|
|   | (Mín. / Máx.) |       | ( Mín. / Máx. ) |          |                              | valor        | # Exp. | Factor                              |
| pH  | 6.36          | 6.37  | 4.22            | 4.75     | 0.64                         | - 2.13       | 1      | CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28    |
| Ac. láctico (g/l)                             | 0.15          | 0.23  | 1.32            | 2.98     | 8.09                         | 2.75         | 1      | CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28    |
| Carb. Tot. (g/l)                              | 16.44         | 17.95 | 9.40            | 10.89    | 6.49                         | - 8.03       | 3      | CaCO <sub>3</sub> 0.03,<br>Temp. 28 |
| Azúc Red. (g/l)                               | 5.09          | 5.72  | 1.95            | 3.23     | 3.86                         | - 3.77       | 3      | CaCO <sub>3</sub> 0.03,<br>Temp. 28 |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)                   | 9.72          | 11.35 | 7.45            | 8.29     | --                           | - 3.90       | 1      | CaCO <sub>3</sub> 0,<br>Temp. 28    |
| Activ. Amil.<br>Extracel. (U/l) <sup>b)</sup> | 0             | 18.17 | 38.72           | 3,204.43 | 4.22                         | 3,204.43     | 4      | CaCO <sub>3</sub> 0.03,<br>Temp. 35 |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red. en c / experimento

b) U / l: Cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa/min, por cada litro de caldo fermentado y centrifugado; a 37°C, pH= 5.5.

c) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro. Cada experimento inicial o final se calculó por: C. V.= (Desv. Est./Prom.) • 100.

d) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie después de la fermentación

**Cuadro 27**  
**Análisis de varianza del consumo de almidón *in situ* en la 2ª serie**  
**de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus* (A.O. L8)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F c/ error<br>confundido | Significan-<br>cia, factor | Contribu-<br>ción P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 : A=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 3.983    | 16.154         | 13.815                   | ***CaCO <sub>3</sub>       | 56.6                    |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 0.218    | 0.883          |                          |                            |                         |
| 3 : A x B                            | 1           | 0.526    | 2.133          |                          |                            |                         |
| 4 : error                            | 1           | 0.031    | 0.127          |                          |                            |                         |
| 5 : error                            | 1           | 0.019    | 0.079          |                          |                            |                         |
| 6 : error                            | 1           | 0.001    | 0.005          |                          |                            |                         |
| 7 : error                            | 1           | 0.934    | 3.789          |                          |                            |                         |
| <b>TOTAL:</b>                        | 7           |          |                |                          |                            | 100                     |
| error directo                        | 4           | 0.247    |                |                          |                            |                         |
| error confundido                     | 6           | 0.288    |                |                          |                            |                         |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                          |                            | 56.6                    |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                          |                            | 43.4                    |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb\*\*\*</sub> (1/6) = 13.70, α = 0.01

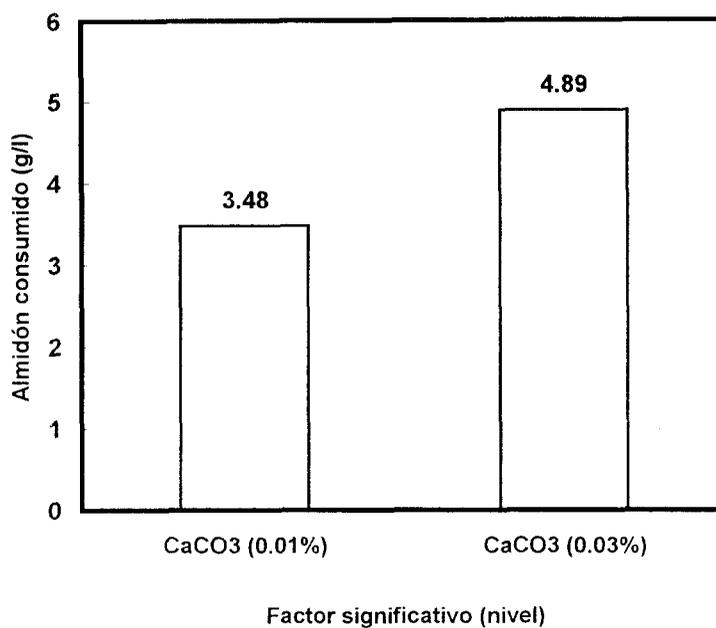


Fig. 13 Factor significativo para el consumo de almidón por *Lb. acidophilus*. 2ª serie de almidón

**Cuadro 28**  
**Ecuación de estimación de medias del consumo de almidón *in situ***  
**en la 2ª Serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus***

| Factores<br>Significativos | Medias ( g/l ) |         | g.l.<br>(n-1) | Nivel       |
|----------------------------|----------------|---------|---------------|-------------|
|                            | Nivel 1        | Nivel 2 |               |             |
| A CaCO <sub>3</sub>        | -3.48          | -4.89   |               | N-2: 0.03 % |
| Media                      | -4.19          |         | 0             |             |

$$\mu_{(A_2)} = \bar{A}_2 - g.l. (\mu_{T\alpha.})$$

$$\mu_{(A_2)} = 4.89 - 0(-4.19)$$

$$\mu_{(A_2)} = 4.89 \quad \text{Almidón consumido } in situ, \text{ g/l}$$

La actividad amilolítica extracelular *in vitro* se incrementó únicamente cuando se fermentó a 35°C (Cuadro 22). El análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989) aplicado corroboró esta observación pues el análisis de varianza dio una alta significancia a la temperatura, mientras que su contribución porcentual explicó cerca del 100% de la variación de la actividad amilolítica dentro de la serie (Cuadro 29). Los valores promedio de la variable de respuesta (cambio en la actividad amilolítica) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 14. Después de calcular la ecuación de medias (Cuadro 30) se seleccionó la temperatura de 35°C como la mejor para incrementar la actividad amilolítica extracelular durante la fermentación, de acuerdo al valor teórico calculado.

*Conclusiones.* El resumen del análisis estadístico de la 2ª serie de experimentos en el Cuadro 31 incluye los datos de ambos microorganismos. Queda claro que el nivel alto del CaCO<sub>3</sub> fue el más recomendable para las dos bacterias; sin embargo, las mejores temperaturas para la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus* y para la actividad amilolítica de *Lb. acidophilus* fueron diferentes. Es evidente que la temperatura óptima deberá definirse en el cultivo mixto de la siguiente serie (3ª).

**Cuadro 29**  
**Análisis de varianza del cambio de actividad amilolítica extracelular**  
**en la 2ª serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus* (A.O. L8)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | F <i>cl</i> error<br>confundido | Significan-<br>cia, factor | Contribu-<br>ción P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 : A=CaCO <sub>3</sub>              | 1           | 0.242    | 17.236         |                                 |                            |                         |
| 2 : B=Temp.                          | 1           | 55.986   | 3983.637       | 730.105                         | *** Temp.                  | 99.2                    |
| 3 : A x B                            | 1           | 0.162    | 11.502         |                                 |                            |                         |
| 4 : error                            | 1           | 0.045    | 3.197          |                                 |                            |                         |
| 5 : error                            | 1           | 0.004    | 0.263          |                                 |                            |                         |
| 6 : error                            | 1           | 0.001    | 0.065          |                                 |                            |                         |
| 7 : error                            | 1           | 0.007    | 0.475          |                                 |                            |                         |
| <b>TOTAL:</b>                        | 7           |          |                |                                 |                            | 100                     |
| <b>error</b> directo                 | 4           | 0.014    |                |                                 |                            |                         |
| <b>error</b> confundido              | 6           | 0.077    |                |                                 |                            |                         |
| <b>P</b> factores Signif.            |             |          |                |                                 |                            | 99.2                    |
| <b>P</b> residual                    |             |          |                |                                 |                            | 0.8                     |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb\*\*\*</sub> (1/6) = 13.70,  $\alpha = 0.01$ .

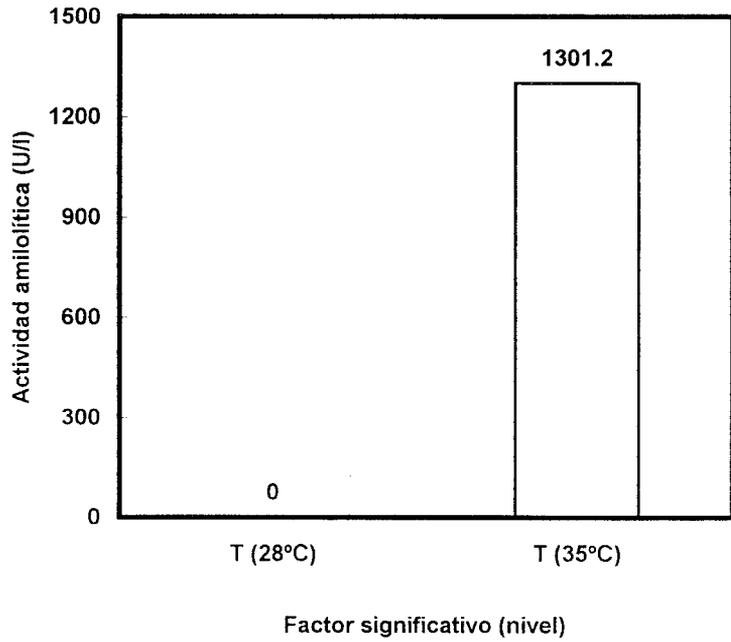


Fig. 14 Factor significativo para el cambio de actividad amilolítica por *Lb. acidophilus*. 2ª serie de almidón

Cuadro 30

Ecuación de estimación de medias del cambio de actividad amilolítica extracelular en la 2ª serie de cultivos en almidón con *Lb. acidophilus*

| Factores<br>Significativos | Medias (U/l) |         | g.l.<br>(n-1) | Nivel      |
|----------------------------|--------------|---------|---------------|------------|
|                            | Nivel 1      | Nivel 2 |               |            |
| <b>B</b> Temp.             | 0            | 1 301.2 |               | N-2: 35 °C |
| Media                      | 650.6        |         | 0             |            |

g.l. = grados de libertad

U = Unidad; cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  glucosa / min (37°C, pH=5.5)

$$\mu_{(B2)} = \bar{B}_2 - g.l. (\mu_{\text{Tot.}})$$

$$\mu_{(B2)} = 1\,301.2 - 0 (650.6)$$

$$\mu_{(B2)} = 1\,301.2 \text{ U/l Act. amilasa extracelular}$$

**Cuadro 31**  
**Resumen del análisis estadístico de la 2ª serie de cultivos en almidón**

| Factores e interacciones significativas | Niveles seleccionados <sup>(a)</sup> <sup>(b)</sup> para: |   |   |
|---|---|---|---|
|   | <i>Pd. pentosaceus</i>                                    | <i>Lb. acidophilus</i>                                      |   |
|   | Producción de diacetilo, 77.78 mg/l <sup>(c)</sup>        | Consumo de almidón <i>in situ</i> , 4.89 g/l <sup>(c)</sup> | Cambio Activ. amilolítica, 1 301.2 U/l <sup>(c)</sup> |
| Temp. (°C)                              | 28 (63.9) ***   | -   | 35 (99.2) ***   |
| CaCO <sub>3</sub> (%)                   | 0.03 (20.2) ***   | 0.03 (56.6) ***   | -   |
| T / CaCO <sub>3</sub> (°C, %)           | 28 / 0.01 (8.7) **  | -   | -   |

a) Contribuciones porcentuales al efecto total, %.

b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.01.

c) Valores teóricos calculados con las ecuaciones de estimación de medias.

Al comparar los resultados de esta serie con la precedente, destaca que en general la brecha entre los valores finales máximos y mínimos entre experimentos disminuyó, debido a la presencia de glucosa y de extracto de levadura en todos los medios de cultivo y a que se evitaron las interferencias del citrato y de la treonina. La producción de diacetilo y de ácido láctico mejoraron en esta serie a pesar de que el consumo de carbohidratos fue menor; lo que indica que fue más eficiente la transformación de los substratos en productos y en consecuencia, la acidificación más acelerada del caldo pudo interrumpir la fermentación sin completar el consumo de almidón.

### 3ª SERIE.

*Cultivo mixto de Pd. pentosaceus y Lb. acidophilus.* En estos cultivos se utilizaron los parámetros seleccionados en las dos series anteriores, pero se llevaron a cabo cultivos axénicos mixtos en medio de almidón, inoculando con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*. El medio de cultivo tuvo la siguiente composición en toda la serie, en g/l de H<sub>2</sub>O destilada: almidón soluble, 5; glucosa, 10; peptona de caseína, 2; extracto de levadura, 2; CaCO<sub>3</sub>, 0.3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.1 y solución de vitaminas y minerales, 5 ml.; pH = 6.5). El objetivo principal fue determinar el efecto de **la temperatura (Factor A)** en la producción de diacetilo en los cultivos mixtos. Los cultivos se realizaron durante 5 días a tres niveles de temperatura: 28, 32 y 35°C, cada uno por duplicado. Los dos niveles de temperatura estudiados en los cultivos axénicos

de almidón tuvieron efectos que variaban según la cepa y la variable de respuesta, por lo que no se pudo seleccionar para este cultivo mixto un solo valor de temperatura de incubación. Por lo tanto, se añadió un tercer nivel intermedio a los otros dos evaluados previamente. Se analizaron los siguientes parámetros al inicio y final de la fermentación: pH, ácido láctico, carbohidratos (totales y reductores), diacetilo y A.G.V. También se determinaron las cuentas viables de los inóculos axénicos y las de los cultivos finales mixtos. La baja dispersión de los resultados de los análisis químicos y biológicos (error experimental) se verificó con los valores promedio de los coeficientes de variación por parámetro ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ). El análisis estadístico con un solo factor nos permite determinar si el efecto de éste es realmente significativo o solo aparenta serlo, además de seleccionar con validez el mejor nivel. Se aplicaron tratamientos estadísticos de Taguchi (Ross, 1989) para evaluar el efecto de la temperatura en el consumo de almidón y en la producción de diacetilo con un A.O. L9 (Cuadro 4). Este diseño requería tres datos por cada nivel evaluado; como los cultivos se realizaron por duplicado solamente, para el tercer valor se consideró el valor promedio de las variables de respuesta de cada experimento.

Los datos resumidos de los análisis químicos se presentan en el Cuadro 32.

**Cuadro 32**  
**Resumen de los datos analíticos de la 3ª serie de cultivos de almidón.**  
**Cultivos mixtos con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus***

| Parámetros<br>Analizados                   | Inicial <sup>c)</sup><br>( $\bar{x}$ ) | Finales<br>(Mín. / Máx.) |        | C. V. <sup>e)</sup><br>(%) | Mayor cambio <sup>f)</sup> |        |                     |
|--|--|--------------------------|--------|----------------------------|----------------------------|--------|---------------------|
|  |  |                          |        |                            | valor<br>(Fin.-Ini.)       | # Exp. | Factor<br>A<br>(°C) |
| pH   | 6.73                                   | 4.58                     | 4.69   | 0.32                       | - 2.15                     | 3      | 35                  |
| Ac. láctico (g/l)                          | 0                                      | 2.56                     | 3.08   | 4.10                       | 3.08                       | 2      | 32                  |
| Carb. Tot. (g/l)                           | 9.91                                   | 7.11                     | 7.91   | 1.10                       | - 2.80                     | 2      | 32                  |
| Azúc. Red. (g/l)                           | 4.83                                   | 2.07                     | 3.13   | 2.51                       | - 2.76                     | 2      | 32                  |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)                | 5.07                                   | 4.78                     | 5.04   | --                         | - 0.29                     | 1      | 28                  |
| Ác. acético <sup>b)</sup> (mg/l)           | 50.58                                  | 79.42                    | 105.25 | 14.00                      | 54.67                      | 2      | 32                  |
| Ác. propiónico <sup>b)</sup> (mg/l)        | 57.13                                  | 59.95                    | 67.22  | 2.64                       | 10.09                      | 3      | 35                  |
| Ác. butírico <sup>b)</sup> (mg/l)          | 31.31                                  | 34.15                    | 40.12  | 1.53                       | 8.81                       | 1      | 28                  |
| Diacetilo <sup>b)</sup> (mg/l)             | 76.06                                  | 117.88                   | 134.76 | 9.87                       | 58.72                      | 2      | 32                  |
| Cuenta viable<br>(U.F.C./ml) $\times 10^7$ | 0.103 <sup>d)</sup>                    | 0.15                     | 1.28   | 5.45                       | 1.18                       | 2      | 32                  |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red. en c / experimento.

b) Determinado por cromatografía gas / líquido.

c) La composición inicial fue común a los tres cultivos.

d) Valor calculado considerando las cuentas de los inóculos axénicos y la dilución al inocular.

e) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro. Cada experimento inicial o final se calculó por: C. V. = (Desv. Est./Prom.)  $\bullet 100$ .

f) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie después de la fermentación.

Se observó una drástica disminución de los valores de pH en los cultivos mixtos, siendo la mayor a 35°C (-2.15). Los valores finales de pH de esta serie fueron similares a los observados previamente en los cultivos axénicos más activos. La producción de ácido láctico también fue intensa pero en este caso, el mayor cambio (3.08 g/l) ocurrió a 32°C, siendo el valor más elevado de las tres series.

La concentración de almidón soluble en el medio de cultivo utilizado aquí fue de 5 g/l, debido a que se deseaba disminuir los contenidos residuales; sin embargo, los consumos de almidón fueron más bajos de lo esperado (Cuadro 33). Se observó que en los cultivos que presentaron una mayor producción de ácido láctico (a 32 y 35°C), el consumo de almidón se inhibió más, por lo que la temperatura más favorable para el consumo de almidón en los cultivos mixtos resultó ser la de 28°C.

Ya en la 2ª serie se había determinado que la temperatura no influía significativamente en los consumos de almidón *in situ* por ambas bacterias, siempre y cuando se tuviera un control suficiente de pH, gracias al efecto del CaCO<sub>3</sub>, pero en los cultivos mixtos la capacidad de regulación fue sobrepasada por el exceso de ácido producido, con lo que la notable disminución del pH pudo influir en el parco consumo de almidón en las tres temperaturas, pues las amilasas de las bacterias lácticas suelen inhibirse a valores de pH menores a 5.0 (Champ *et al.*, 1983; Giraud *et al.*, 1993; Li y Chan, 1983; Olympia *et al.*, 1995).

**Cuadro 33**  
**Variables de respuesta para los análisis estadísticos**  
**de la 3ª serie de cultivos de almidón. Cultivos mixtos**  
**con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus***

| No. | Temp<br>(°C) | Almidón<br>( g/l ) | Diacetilo<br>( mg/l ) |
|-----|--------------|--------------------|-----------------------|
| 1   | 28           | - 0.300            | 45.16                 |
| 1'  | 28           | - 0.281            | 42.73                 |
| 1'' | 28           | - 0.290            | 39.86                 |
| 2   | 32           | - 0.036            | 56.78                 |
| 2'  | 32           | - 0.034            | 64.88                 |
| 2'' | 32           | - 0.370            | 62.00                 |
| 3   | 35           | - 0.192            | 53.43                 |
| 3'  | 35           | - 0.176            | 46.90                 |
| 3'' | 35           | - 0.184            | 44.02                 |

No obstante, los datos de consumo de almidón *in situ* (Cuadro 33) fueron considerados como una variable de respuesta en el análisis estadístico de Taguchi. En base al análisis de varianza y al cálculo de contribuciones porcentuales del Cuadro 34, se deduce que la temperatura sí influyó significativamente en el consumo de almidón *in situ*. Los valores promedio de la variable de respuesta (consumo de almidón) calculados con los resultados de los experimentos de los niveles del factor significativo se muestran en la Fig. 15. La temperatura de 28°C fue la que favoreció el mayor cambio de esta variable (Cuadro 35), es decir que a esa temperatura se inhibió menos el consumo del almidón. La ecuación de estimación de medias indicó el valor estimado de almidón consumido en ese nivel.

Se calcularon las concentraciones iniciales de bacterias en el cultivo principal, en base a las cuentas viables determinadas en los inóculos axénicos, y el tamaño del inóculo utilizado (0.5% de c/cepa), para *Pd. pentosaceus*, fue de  $9.46 \times 10^5$  y para *Lb. acidophilus* de  $8.89 \times 10^4$  U.F.C./ml. La suma de ambas se muestra como cuenta viable inicial en el Cuadro 32. En las muestras finales se determinaron las cuentas viables totales, ya que no fue posible diferenciar la morfología colonial de las dos bacterias: colonias puntiformes, borde entero, lisas, brillantes y formando un halo de acidificación pequeño, observable gracias al indicador verde de bromo - cresol. El mejor incremento se presentó a 32°C,  $1.18 \times 10^7$  U.F.C./ml, es decir aproximadamente 1.5 veces mayor que el menor presentado a 35°C, por lo tanto se deduce que el crecimiento microbiano también fue influenciado por la temperatura.

**Cuadro 34**  
**Análisis de varianza del consumo de almidón *in situ* en la**  
**3ª serie de cultivos de almidón. Cultivos mixtos con**  
***Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* (A.O. L9)**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | Significan-<br>cia, factor | Contribución P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|----------------------------|--------------------|
| 1 : A=Temp.                          | 2           | 4.90E-2  | 1011.745       | *** Temp.                  | 99.704             |
| 2 : error                            | 2           | 1.06E-4  | 2.197          |                            |                    |
| 3 : error                            | 2           | 1.99E-5  | 0.411          |                            |                    |
| 4 : error                            | 2           | 1.90E-5  | 0.392          |                            |                    |
| <b>TOTAL:</b>                        | 8           |          |                |                            | 100                |
| error directo                        | 6           | 4.85E-5  |                |                            |                    |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                            | 99.704             |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                            | 0.296              |

*g.l.* = grados de libertad

F<sub>Tb\*\*\*</sub> (2/6) = 10.9,  $\alpha = 0.01$ .

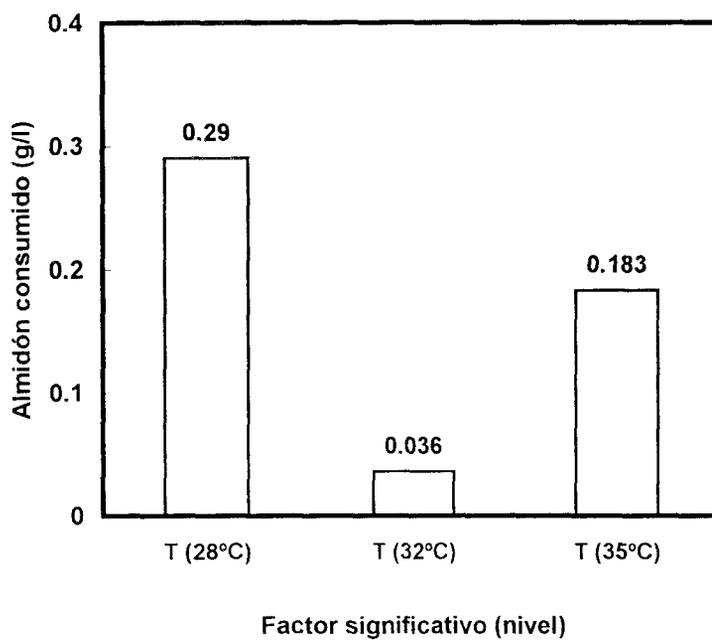


Fig. 15 Factor significativo para el consumo de almidón en cultivos mixtos. 3ª serie de almidón

**Cuadro 35**  
**Ecuación de estimación de medias del consumo de almidón *in situ* en**  
**la 3ª serie de cultivos sumergidos de almidón. Cultivos mixtos**  
**con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus***

| Factores | Medias ( g/l ) |         |         | g.l.<br>(n-1) | Nivel     |
|----------|----------------|---------|---------|---------------|-----------|
|          | Nivel 1        | Nivel 2 | Nivel 3 |               |           |
| A Temp.  | -0.290         | -0.036  | -0.183  |               | N-1: 28°C |
| Media    | -0.170         |         |         | 0             |           |

g.l. = grados de libertad

$$\mu_{(A1)} = \bar{A}_1 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(A2)} = (-0.29) - 0 (-0.17)$$

$$\mu_{(A2)} = -0.29 \text{ Almidón consumido } in \text{ situ, g/l}$$

Rodríguez y Manca (1995a) encontraron que el crecimiento de *Pd. pentosaceus* fue inhibido por la producción excesiva de acidez y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de un lactobacilo, en el presente trabajo es poco probable que el  $H_2O_2$  formado por *Lb. acidophilus* hubiera inhibido al pediococo ya que este último produce una pseudocatalasa que descompone a los peróxidos, pero la excesiva acidez sí pudo inhibirlo.

Era importante conocer los contenidos de los A.G.V. porque en un perfil de nota aromática tipo mantequilla, éstos deben existir, pero no deben sobrepasar los niveles de aceptación sensorial. Con las tres temperaturas de cultivo se produjo más ácido acético que los otros dos A.G.V. (Cuadro 32). La mayor producción de ácido propiónico se observó a 35°C, mientras que para el ácido butírico fue a 28°C.

Se observó una relación metabólica entre varios parámetros, pues la mejor temperatura para la producción del ácido acético (32°C) fue la que produjo más diacetilo y crecimiento microbiano (Cuadro 32). Otras cepas de *Pd. pentosaceus* no son capaces de producir ácido acético (Rodríguez y Manca, 1995b) y algunas lo forman en un nivel muy bajo, 40 mg/l (Rodríguez y Manca, 1994).

Joshi *et al.* (1989) determinaron que en Dhokla, que es un alimento fermentado indú a base de cereales y leche con aroma tipo mantequilla, el contenido de A.G.V. que resultó más aceptable sensorialmente fue de 605.6 mg/l, valor muy superior al máximo acumulado en la serie presente (200.6 mg/l a 35°C). Algunas bacterias lácticas que forman diacetilo también producen A.G.V., como observaron Joshi y Thakar (1993) al madurar quesos parcialmente substituidos con leche - mantequilla; el mejor aroma lo

presentaron los quesos con 9,000 mg/Kg de A.G.V., mientras que el rechazo por los panelistas ocurrió a los 22,800 mg/Kg.

Los valores promedios de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ , que se muestran en el Cuadro 32 indicaron que el error experimental es aceptable; aunque el correspondiente al ácido acético sí sobrepasó el 10%, debido a que el método analítico dio resultados más variables a concentraciones bajas del ácido, como las observadas en las muestras iniciales.

A pesar de que el consumo de los carbohidratos y el crecimiento microbiano fueron bajos, la formación de diacetilo fue más elevada que en la 2ª serie (Cuadro 21). La mayor producción se observó a 32°C, que es un nivel de temperatura que no se había utilizado en las series anteriores. Los datos de diacetilo producido (Cuadro 33) constituyeron la variable de respuesta en el análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989), con el A.O. L9 del Cuadro 4. El análisis de varianza y el cálculo de contribuciones porcentuales aplicados en este caso (Cuadro 36) demostraron que la temperatura tuvo una alta significancia en los cultivos mixtos. Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de diacetilo) calculados con los resultados de los experimentos de los niveles del factor evaluado se muestran en la Fig. 16. Los datos del Cuadro 37 ratificaron que el nivel más efectivo para la producción de diacetilo fue el de 32°C, y con la ecuación de estimación de medias se calculó la producción de diacetilo en ese nivel.

**Cuadro 36**  
**Análisis de varianza de la producción de diacetilo en la**  
**3ª serie de cultivos en almidón. Cultivos mixtos con**  
***Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* (A.O. L9).**

| Fuente variación<br>Columna : factor | <i>g.l.</i> | Varianza | F<br>calculada | Significan-<br>cia, factor | Contribu-<br>ción P (%) |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 : A=Temp.                          | 2           | 2.74.722 | 17.489         | *** Temp.                  | 85.358                  |
| 2 : error                            | 2           | 9.187    | 0.585          |                            |                         |
| 3 : error                            | 2           | 18.969   | 1.208          |                            |                         |
| 4 : error                            | 2           | 18.969   | 1.208          |                            |                         |
| <b>TOTAL:</b>                        | 8           |          |                |                            | 100                     |
| error directo                        | 6           | 15.709   |                |                            |                         |
| <b>P factores Signif.</b>            |             |          |                |                            | 85.358                  |
| <b>P residual</b>                    |             |          |                |                            | 14.642                  |

*g.l.* = grados de libertad  
 $F_{Tb}^{***} (2/6) = 10.9, \alpha = 0.01.$

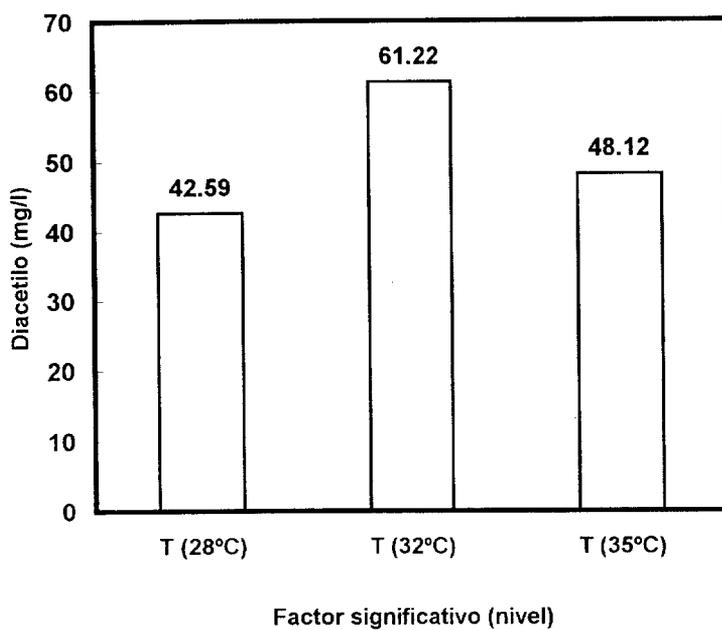


Fig. 16 Factor significativo para la producción de diacetilo en cultivos mixtos. 3ª serie de almidón

**Cuadro 37**  
**Ecuación de estimación de medias de la producción de diacetilo en la**  
**3ª serie de cultivos sumergidos en almidón. Cultivos mixtos con**  
***Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus***

| Factores   | Medias ( g/l ) |         |         | g.l.<br>(n-1) | Nivel     |
|------------|----------------|---------|---------|---------------|-----------|
|            | Nivel 1        | Nivel 2 | Nivel 3 |               |           |
| A    Temp. | 42.586         | 61.220  | 48.120  |               | N-2: 32°C |
| Media      | 50.642         |         |         | 0             |           |

*g.l.* = grados de libertad

$$\mu_{(A_2)} = \bar{A}_2 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(A_2)} = 61.22 - 0 (50.64)$$

$$\mu_{(A_2)} = 61.22 \text{ Diacetilo producido, mg/l}$$

En estos cultivos mixtos, la mejor temperatura de producción de diacetilo fue ligeramente superior al rango óptimo de crecimiento de *Pd. pentosaceus*, que está entre 28 – 30°C (Garvie, 1986); lo que es peculiar, pues otras bacterias lácticas mesófilas han producido mayores cantidades de diacetilo entre 18 y 24°C en cultivos axénicos (Escamilla *et al.*, 1996a; Green y Manning, 1982; Yadav y Srinivasan, 1985).

El tipo de sustrato también tiene influencia en la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus*, pues en investigaciones en donde se han utilizado cepas de esta especie con iniciadores mixtos para quesos, si bien se han logrado desarrollar aromas agradables atribuidos a la proteólisis, la producción de diacetilo ha sido muy pobre o nula (Martins *et al.*, 1979; Tzanetakis *et al.*, 1991; Vafopoulou *et al.*, 1990). Por otro lado, en los estudios de caracterización de la cepa utilizada en el presente trabajo, se observó una formación de diacetilo nula o muy débil cuando se utilizaron glucosa o almidón, como fuentes únicas de carbono (Verde *et al.*, 1995), pero al conjuntar ambas en el mismo medio de cultivo, *Pd. pentosaceus* produjo niveles más elevados de diacetilo. De manera similar, la producción de este compuesto se ha observado en las fermentaciones lácticas mixtas de otros productos amiláceos como el Dhokla, alcanzando un contenido de 2.03 mg/Kg (Escamilla *et al.*, 1996b; Joshi *et al.*, 1989). También en ciertos alimentos tradicionales mexicanos de maíz, como el pozol y el atole de maíz agrio, que presentaron una nota aromática a mantequilla detectada por medio del análisis sensorial (Olguín *et al.*, 1988); o en productos tipo yoghurt a base de soya, con un contenido máximo de diacetilo de 80 µg/Kg que fue 3.8 veces la del yoghurt normal (Granata y Morr, 1996).

En el sistema mixto, la temperatura de 32°C favoreció las variables relacionadas directamente con el consumo de glucosa, como son las cuentas viables y los rendimientos de los ácidos láctico y acético, y probablemente, la producción de diacetilo. También se observó en este caso que la acidez acumulada no inhibió la síntesis de diacetilo, como lo hizo con el consumo de almidón.

. El diacetilo formado por fermentación láctica alcanza normalmente un nivel de 0.5 a 20 mg/Kg en los productos lácteos, nivel muy superior a su umbral de detección olfativa, que varía entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dependiendo del alimento en el que se encuentre y de la sensibilidad del jurado. Por otro lado, la aromatización artificial con nota tipo mantequilla que se aplica a diversos alimentos (repostería, botanas, confitería, productos lácteos formulados, etc.) suele tener un nivel de diacetilo en el rango de 100 - 300 mg/Kg, ya que debido a las pérdidas por los procesos se reduce a un contenido apropiado (Escamilla *et al.*, 1996b). La concentración alcanzada a 32°C en el cultivo mixto de este trabajo, 134.76 mg/l, se ubicó dentro del rango mencionado.

*Conclusiones.* Se determinó con estos cultivos mixtos que la mejor temperatura para la formación del diacetilo fue de 32°C. Los consumos de glucosa y los rendimientos de cuentas viables, de ácido láctico, de ácido acético y de diacetilo respondieron a las temperaturas de incubación con tendencias similares, indicando que hay una relación metabólica entre ellos, aunque la producción de diacetilo no dependió únicamente del consumo de glucosa, sino que también del consumo de almidón.

En los tres cultivos mixtos se obtuvieron niveles elevados de acidez, que originaron menores consumos de almidón en comparación a los observados en los cultivos axénicos, pero los rendimientos de diacetilo fueron superiores en los cultivos mixtos.

Los elevados niveles de diacetilo formados en estos cultivos mixtos, justifican el interés de determinar algunos factores de preparación y fermentación de una materia prima amilácea con nota aromática tipo mantequilla, que en un futuro pueda ser usada (previo desarrollo tecnológico) en la formulación de varios alimentos procesados.

#### ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Derivado de los resultados de estas series de cultivos en medio a base de almidón se preparó un artículo de investigación, que ha sido aceptado para publicación, la cual probablemente corresponderá al No. 2 del año 2000, según el último comunicado recibido del editor. La copia de la prueba de galera se muestra en el Anexo 4. La referencia es la siguiente:

Escamilla, M.L., Valdés, S., Soriano, J. y Tomasini, A. 2000. Effect of some nutritional and environmental parameters on the production of diacetyl and starch consumption by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in submerged cultures. J. Appl. Microbiol. (En prensa).

## DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN MEDIOS SEMISÓLIDOS A BASE DE MAÍZ.

### 1ª SERIE. EFECTO DE LAS OPERACIONES DE PRETRATAMIENTO DE MAÍZ.

Se llevaron a cabo cultivos lácticos mixtos en medios a base de maíz con el objetivo de producir diacetilo en concentraciones superiores las que se obtienen en los cultivos realizados a nivel comercial en leche (13 –18 mg/l). También se consideró importante controlar la producción de ácido láctico y de los A.G.V., para que se produzcan como parte del aroma y del sabor tipo mantequilla que se espera, pero sin excederse (ácido láctico: 2 – 5 g/l; A.G.V.: 20 - 1 800 mg/Kg).

La 1ª serie se realizó para determinar la influencia de las condiciones de pretratamiento de maíz en la producción de diacetilo, A.G.V. y ácido láctico. Las operaciones de pretratamiento de maíz evaluadas fueron: **molienda y tamizado, tiempo de nixtamalización, cocimiento del harina y desengrasado** (Cuadro 5). Estas condiciones fueron introducidas en el A.O. L8 de Taguchi (Ross,1989) que se muestra en el Cuadro 6, de acuerdo al diseño de la gráfica lineal de la Fig. 5.

Los cultivos semisólidos se inocularon con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*, de acuerdo a la metodología indicada en el capítulo correspondiente. Los experimentos se realizaron por duplicado, usando las distintas masas preparadas como medios de cultivo. Las condiciones de fermentación fueron las que se establecieron en los sistemas

a base de almidón, como las concentraciones de extracto de levadura: 0.2 % y de  $\text{CaCO}_3$ : 0.03 %, incubando a 32°C. En este caso se decidió no adicionar glucosa. Se analizaron los siguientes parámetros al inicio y final de cada fermentación, por duplicado: peso, pH, concentraciones de carbohidratos totales, de azúcares reductores, de diacetilo y de los ácidos: láctico, acético, propiónico y butírico. Se calcularon los coeficientes de variación (C.V.) al inicio y al final de cada cultivo. Después se calcularon los valores medios por parámetro ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ) para presentar el error experimental en la serie de manera resumida. También se determinaron los cambios originados en el cultivo (valor final menos el inicial de cada parámetro).

La consistencia semisólida que se obtuvo en los productos fermentados se seleccionó considerando varios criterios: la posibilidad de obtener mayores concentraciones de compuestos aromatizantes, consistencia más homogénea y menor volumen que en un cultivo sumergido. Se consideró que las suspensiones diluidas de harina de maíz (cocidas o no) tienden a precipitar (Mercier *et al.*, 1992); que los nutrientes son más accesibles a los microorganismos que en un cultivo sólido, y finalmente, que la apariencia del producto es apropiada ingrediente aromatizado en la industria alimentaria.

El resumen de los resultados analíticos se presenta en el Cuadro 38. Los coeficientes de variación calculados con los parámetros analíticos indicaron que los análisis fueron aceptables (C.V. < 10).

**Cuadro 38**  
**Resumen de los datos analíticos de la 1ª serie de cultivos en maíz.**  
**Efecto de los factores de pretratamiento de maíz**

| Parámetros<br>analizados        | Iniciales<br>( Min. / Máx. ) | Finales<br>( Min. / Máx. ) | C. V. <sup>a)</sup><br>( % ) | Mayor cambio <sup>b)</sup> |           |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------|
|                                 |                              |                            |                              | valor<br>(Fin. - Ini.)     | #<br>Exp. |
| Carbohidratos<br>totales (g/Kg) | 145.82 / 230.85              | 142.55 / 218.48            | 0.30                         | -24.4                      | 5         |
| Azúcares<br>reductores (g/Kg)   | 10.74 / 25.34                | 6.11 / 12.30               | 5.17                         | -17.18                     | 5         |
| Almidón (g/Kg)                  | 130.52 / 208.69              | 137.15 / 211.23            | --                           | -16.74                     | 7         |
| Ac. láctico (g/Kg)              | 0.22 / 2.28                  | 5.24 / 9.82                | 1.92                         | 9.32                       | 5         |
| pH                              | 5.54 / 6.34                  | 4.47 / 4.82                | 0                            | -1.81                      | 5         |
| Ác. acético (mg/Kg)             | 58.68 / 386.18               | 82.49 / 566.45             | 1.45                         | 273.64                     | 7         |
| Ác Prop. (mg/Kg)                | 495.79 / 670.92              | 538.90 / 707.88            | 0.78                         | 132.47                     | 5         |
| Ác. butírico (mg/Kg)            | 230.88 / 459.63              | 356.23 / 783.17            | 2.12                         | 472.64                     | 5         |
| Diacetilo (mg/Kg)               | 116.40 / 1435.85             | 114.48 / 2671.17           | 4.38                         | 1235.32                    | 5         |

a) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro, calculado con los C.V. de cada experimento: C. V.= (Desv. Est./Prom.) • 100

b) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie, después de la fermentación

Se observó disminución en el contenido de carbohidratos totales y de azúcares reductores en todos los experimentos durante la fermentación. La mayor disminución de éstos se observó en el experimento # 5, masa preparada con maíz nixtamalizado por 5 min; harina con tamaño de partícula entre las mallas No. 20 y 40; con desengrasado y cocimiento durante 25 min. De esta manera, se obtuvo harina de partícula gruesa y poco cocida.

El consumo de azúcares reductores durante la fermentación fue similar en toda la serie, excepto para el Exp. # 5, que tuvo un consumo aproximado de la mitad del valor inicial. Se observó que el cocimiento de 25 min favoreció a los consumos de carbohidratos totales y de azúcares reductores. La diferencia de valores entre los carbohidratos totales y los azúcares reductores se puede atribuir al contenido de carbohidratos no reductores de las masas, representados por su componente principal, el almidón (Cuadro 38). El consumo de almidón por los microorganismos fue mejor en las masas preparadas con nixtamalización prolongada (20 min) y partícula gruesa (> malla 40), y el máximo consumo se observó en el Exp. No. 7, realizado con la masa preparada en las condiciones previamente indicadas, además de que se realizó en desengrasado del harina, y el cocimiento durante 25 min.

Todos los cultivos acidificaron durante la fermentación, según se desprende de los datos de ácido láctico y pH del Cuadro 38. La producción de ácido láctico en esta serie tuvo una clara relación con el contenido de azúcares reductores iniciales en las masas, pues las que tenían mayor concentración de azúcares simples dieron origen a cultivos con mayor acumulación del ácido, como consecuencia de un

metabolismo energético más activo. Sin embargo, como las masas tenían adicionado  $\text{CaCO}_3$ , se controló la caída del pH a valores entre 4.5 - 4.8. Valores similares, 4.46 - 4.66, son los normales en la leche fermentada tipo buttermilk (Vasavada y White, 1979), o en el yoghurt de soya, 4.5 - 4.7; aunque el rango aceptable para el yoghurt lácteo es ligeramente menor, 4.3 - 4.5 (Nsofor *et al.*, 1992). El cultivo que tuvo los mayores cambios de ácido láctico y pH fue el mismo descrito para el consumo de los carbohidratos totales y azúcares reductores (Exp. 5). La concentración de ácido láctico máxima en esta serie, 9.82 g/Kg, superó a la observada en el pozol, 3.98 g/kg (Silva *et al.*, 1991) y a la obtenida en los cultivos sumergidos mixtos a base de almidón, con 3.08 g/l. Otros alimentos comparables tienen valores semejantes a los presentes, como los observados en la leche fermentada tipo buttermilk (Vasavada y White, 1979), o la leche de soya (Granata y Morr, 1996).

La producción de ácido láctico en niveles superiores a 5 g/l es indeseable en alimentos amiláceos fermentados, pues resultan demasiado ácidos en productos en donde se desea destacar los aromas y no la acidez (Coleman y Oraikul, 1989). Por otro lado, los valores muy bajos (< 2.0 g/l) difícilmente pueden proteger a las masas del desarrollo de otros microorganismos, si se trata de cultivos no axénicos, como en este caso. Por estas razones, era importante determinar cuáles factores del pretratamiento de maíz influyeron en la producción del ácido láctico, y así poder controlar la producción

El ácido láctico producido (Cuadro 39) fue considerado como una variable de respuesta en el análisis estadístico de Taguchi (Ross, 1989). El análisis de varianza mostrado en el Cuadro 40 determinó que la nixtamalización fue la operación que influyó más ( $P < 0.01$ ) en la producción del ácido láctico durante la fermentación; aunque también fueron importantes ( $P < 0.05$ ): el desengrasado y la interacción entre la: nixtamalización y la molienda + tamizado. El cálculo de la contribución porcentual presentado en el Cuadro 40 muestra que el efecto conjunto de los factores mencionados fueron capaces de explicar el 84% de los efectos totales de la serie en la producción del ácido.

Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de ácido láctico) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 17. El Cuadro 41 muestra las condiciones de las operaciones de pretratamiento de maíz significativas para la producción de ácido láctico: nixtamalización durante 5 min, desengrasado del harina y la interacción del tamizado para obtener harina de partícula gruesa ( $>$  malla 40, ó 0.42 mm) con la nixtamalización. El valor de producción de ácido láctico estimado con la ecuación de estimación de medias del mismo cuadro dio un resultado ligeramente menor que la producción máxima obtenida en la serie (Exp. 5), y dentro de los niveles deseados, según se indicó previamente.

**Cuadro 39**  
**VARIABLES DE RESPUESTA PARA LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA 1ª SERIE DE CULTIVOS EN MAÍZ. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE MAÍZ EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO, ÁCIDO BUTÍRICO Y DIACETILO**

| No. Exp. | Factores                                   | Ác. láctico (g/Kg) | Ác. butírico (mg/Kg) | Diacetilo (mg/Kg) |
|----------|--|--------------------|----------------------|-------------------|
| 1        | Mol. y Tam < malla 40, Coc. 25, Deseng. No | 5.24               | 357.13               | 48.76             |
| 2        | Mol. y Tam < malla 40, Coc. 55, Deseng. Si | 7.46               | 307.16               | 198.87            |
| 3        | Mol. y Tam < malla 40, Coc. 25, Deseng. Si | 5.46               | 118.61               | 691.28            |
| 4        | Mol. y Tam < malla 40, Coc. 55, Deseng. No | 4.53               | 13.81                | -293.53           |
| 5        | Mol. y Tam > malla 40, Coc. 25, Deseng. Si | 9.32               | 472.64               | 1235.32           |
| 6        | Mol. y Tam > malla 40, Coc. 55, Deseng. No | 6.59               | 125.34               | -370.02           |
| 7        | Mol. y Tam > malla 40, Coc. 25, Deseng. No | 3.08               | 153.84               | -607.14           |
| 8        | Mol. y Tam > malla 40, Coc. 55, Deseng. Si | 3.75               | 245.36               | -137.68           |

Cuadro 40

Análisis de varianza y contribución porcentual de la 1ª serie de cultivos en maíz (A.O. L8).  
Efecto de las operaciones de pretratamiento de maíz en la producción de ácido láctico

| Fuente variación /<br>Columna : factor | g.l. <sup>a)</sup> | Varianza | F c/error<br>Confundido | Significancia <sup>b)</sup> y factor | Contribución<br>P (%) |
|--|--------------------|----------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 : A=Mol+Tam                          | 1                  | 0.0003   |                         |                                      |                       |
| 2 : B=Tiem Nixt                        | 1                  | 17.373   | 48.914                  | ***Nixtamalización                   | 57.2                  |
| 3 : A x B                              | 1                  | 5.055    | 13.651                  | **Mol. + Tam/ Nixt.                  | 12.8                  |
| 4 : C=Cocim.                           | 1                  | 0.071    |                         |                                      |                       |
| 5 : A x C                              | 1                  | 1.403    |                         |                                      |                       |
| 6 : B x C                              | 1                  | 0.008    |                         |                                      |                       |
| 7 : D= Deseng.                         | 1                  | 5.366    | 14.489                  | **Desengrasado                       | 14.0                  |
| <b>TOTAL:</b>                          | 7                  |          |                         |                                      | 100                   |
| <b>error confundido</b>                | 4                  | 0.370    |                         |                                      |                       |
| <b>P factores Significativos</b>       |                    |          |                         |                                      | 84.0                  |
| <b>P residual</b>                      |                    |          |                         |                                      | 16.0                  |

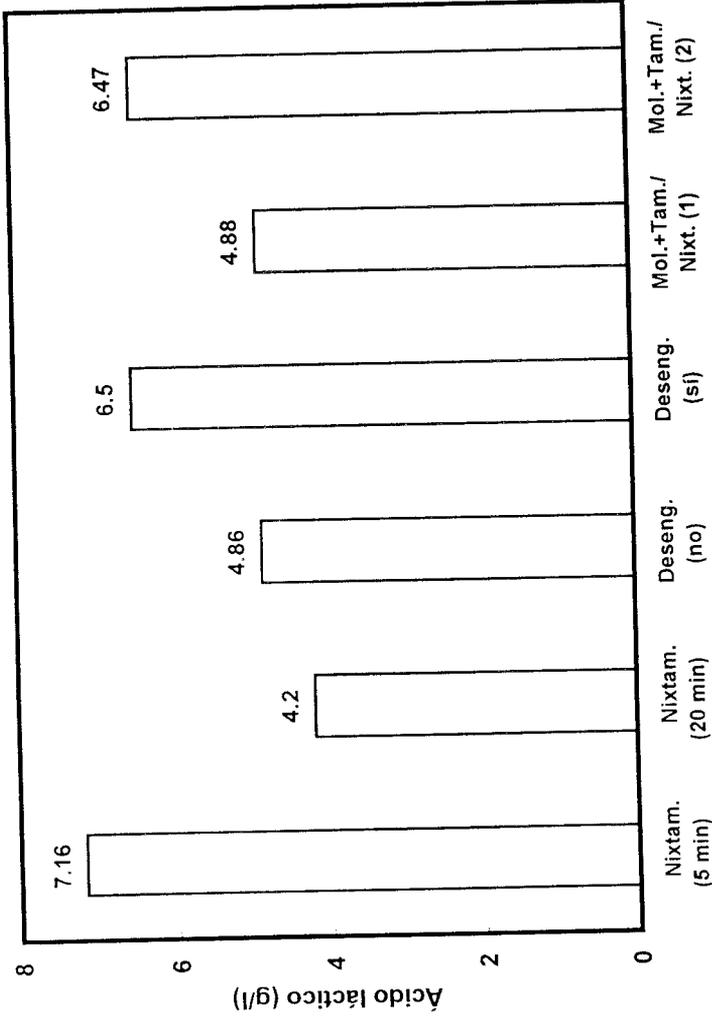
a) g.l. = grados de libertad.

b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01.

F<sub>Tb\*</sub> (1, 4) = 4.54

F<sub>Tb\*\*</sub> (1, 4) = 7.71

F<sub>Tb\*\*\*</sub> (1, 4) = 21.20



Factores significativos (nivel)

Fig. 17 Factores significativos para la producción de ácido láctico en cultivos mixtos. 1ª serie de maíz

**Cuadro 41**  
**Ecuación de estimación de medias de la 1ª serie de cultivos en maíz. Efecto de las operaciones de pretratamiento de maíz en la producción de ácido láctico**

| Factores Significativos                    | Medias (g/Kg) |         | g.l. (n-1) | Niveles                                       |
|--|---------------|---------|------------|---|
|  | Nivel 1       | Nivel 2 |            |   |
| <b>B</b> Nixtamalización                   | 7.16          | 4.20    |            | N-1: 5 min                                    |
| <b>D</b> Desengrasado                      | 4.86          | 6.50    |            | N-2: Sí                                       |
| <b>A x B</b> Mol. + Tam. / nixtamalización | 4.88          | 6.47    |            | N-2: Mol. + Tam.: malla > 40 / Nixtam.: 5 min |
| <b>Media</b>                               | 5.68          |         | 2          |   |

*g.l.* = grados de libertad

$$\mu_{(B1,D2,A-B2)} = \bar{B}_1 + \bar{D}_2 + \bar{A} - \bar{B}_2 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(B1,D2,A-B2)} = 7.16 + 6.50 + 6.47 - 2 (5.68)$$

$$\mu_{(B1,D2,A-B2)} = 20.13 - 11.36$$

$$\mu_{(B1,D2,A-B2)} = 8.77 \quad \text{ácido láctico producido, g/Kg}$$

Se considera que por medio del desengrasado, pudieron eliminarse algunos compuestos oleosolubles, potencialmente inhibitorios para las bacterias lácticas. Las otras condiciones seleccionadas (nixtamalización y molienda + tamizado) favorecieron la disponibilidad de los azúcares reductores, necesarios para la producción del ácido.

Los A.G.V. forman parte del aroma tipo mantequilla en un rango entre 90 a 2 100 mg/Kg (Yadav y Srinivasan, 1985), por lo que se determinaron sus contenidos en las masas antes y después de la fermentación (Cuadro 38). Los A.G.V. de las masas fermentadas pudieron tener diferentes fuentes: los lípidos del maíz, el inóculo y el extracto de levadura adicionados a los medios, y la actividad microbiana durante el cultivo

En esta serie, la adición de extracto de levadura y el tamaño del inóculo fueron factores constantes y por lo tanto, su contribución de A.G.V. también lo fue. Las operaciones de pretratamiento de maíz influyeron al liberar ácidos grasos lo que se reflejó en concentraciones variables de A.G.V. en los medios de cultivo.

El experimento que presentó mayor producción de ácido acético durante el cultivo fue el mismo que consumió más almidón (Exp. # 7); su contenido de ácido acético final fue de 566.45 mg/Kg, valor que supera al formado en los cultivos sumergidos a base de almidón, 203.79 mg/l, o al formado en una mezcla fermentada de cereal y crema, 379 mg/l (Joshi *et al.*, 1989). No obstante, los valores producidos son inferiores a los niveles considerados como pungentes al olfato (> 865 mg/Kg) en los productos lácteos fermentados (Forss, 1979).

Los ácidos propiónico y butírico se acumularon más en el cultivo No. 5, que es donde se consumieron mejor azúcares reductores. Los contenidos máximos de estos ácidos, 707.88 y 783.17 mg/Kg, respectivamente, fueron muy superiores a los correspondientes de los cultivos de almidón, 67.22 mg/l de ácido propiónico y 40.12 mg/l de ácido butírico. También a los acumulados en una mezcla fermentada de cereal y crema, que fueron de 58 y 59 mg/Kg, respectivamente. El ácido butírico es particularmente importante entre los A.G.V., porque cuando se encuentra entre niveles de 16 y 1839 mg/Kg, da una nota aromática tipo queso (Dacremont y Vickers, 1994, Forss, 1979); pero si el contenido es de 3 a 10 veces más, el olor es rancio, nauseabundo y jabonoso (Forss, 1979). Para seleccionar las condiciones de pretratamiento del maíz en esta serie, se consideró entre otros factores, que produjeran bajos contenidos de ácido butírico, como índice de los A.G.V. Aplicando este criterio se observó que los experimentos que usaron harina de partícula gruesa (> malla # 40, ó 0.42 mm) originaron menores contenidos de ácido butírico en los cultivos, posiblemente porque al tener las partículas menor superficie de contacto, las partículas de harina liberan menos A.G.V. ligados a ellas.

Para determinar si los pretratamientos de maíz influyeron en la formación del ácido butírico durante la fermentación, y además, estar en posición de seleccionar aquellas condiciones que produzcan las menores cantidades de ese compuesto, se realizó un estudio estadístico con la metodología de Taguchi (Ross, 1989). Los valores de ácido butírico producido por la fermentación se muestran en el Cuadro 39 y constituyeron la variable de respuesta del análisis estadístico. En el Cuadro 42 se presentan los resultados del análisis de varianza y de la contribución porcentual de los factores e interacciones significativos para esta variable de respuesta. De acuerdo a estos valores, los factores que tuvieron un efecto significativo en la producción de ácido butírico por las bacterias lácticas fueron: la nixtamalización ( $P < 0.05$ ) y el desengrasado ( $P < 0.1$ ), contribuyendo en conjunto con un 87.1% del efecto total. Los valores promedio de la variable de respuesta (menor producción de ácido butírico) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 18. Los niveles que produjeron menos ácido butírico en la fermentación se muestran en el Cuadro 43; la nixtamalización fue de 20 min, y sin desengrasado. La producción estimada con la ecuación de estimación de medias, si se realizara el proceso con esas condiciones fue de 71.2 mg/Kg.

**Cuadro 42**  
**Análisis de varianza y contribución porcentual de la 1ª Serie de cultivos en maíz (A.O. L8). Efecto de las operaciones de pretatamiento de maíz en la producción de ácido butírico**

| Fuente variación / Columna : factor | g.l. <sup>a)</sup> | Varianza | F c/ error Confundido | Significancia <sup>b)</sup> y factor | Contribución P (%) |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 1 : A=Mol+Tam                       | 1                  | 5024.0   |                       |                                      |                    |
| 2 : B=Tem Nix.                      | 1                  | 66730.5  | 21.187                | **Nixtamalización                    | 62.2               |
| 3 : A x B                           | 1                  | 14000.7  | 4.445                 |                                      |                    |
| 4 : C=Cocim.                        | 1                  | 21069.6  | 6.690                 |                                      |                    |
| 5 : A x C                           | 1                  | 1275.1   |                       |                                      |                    |
| 6 : B x C                           | 1                  | 18431.1  | 5.852                 |                                      |                    |
| 7 : D=Deseng.                       | 1                  | 30461.5  | 9.672                 | *Desengrasado                        | 24.9               |
| <b>TOTAL:</b>                       | <b>7</b>           |          |                       |                                      |                    |
| error confundido                    | 2                  | 3149.6   |                       |                                      | 100                |
| <b>P factores Significativos</b>    |                    |          |                       |                                      | 87.1               |
| <b>P residual</b>                   |                    |          |                       |                                      | 12.9               |

a) g.l. = grados de libertad.  
 b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01.  
 Ftb\* (1, 2) = 8.53  
 Ftb\*\* (1, 2) = 18.50  
 Ftb\*\*\* (1, 2) = 93.50

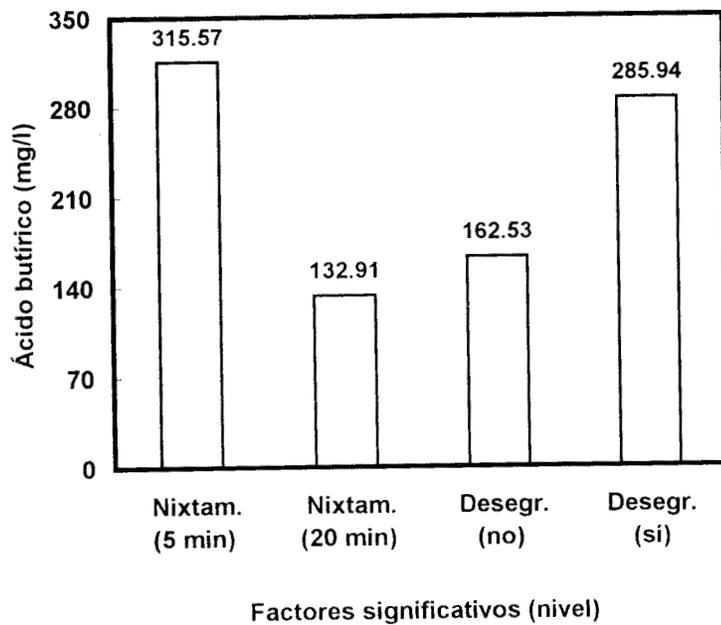


Fig. 18 Factores significativos para la producción de ácido butírico en cultivos mixtos. 1ª serie de maíz

**Cuadro 43**  
**Ecuación de estimación de medias de la 1ª serie de cultivos en maíz. Efecto de las operaciones de pretratamiento de maíz en la menor producción de ácido butírico**

| Factores Significativos | Medias (mg/Kg) |         | g.l. (n-1) | Niveles     |
|-------------------------|----------------|---------|------------|-------------|
|                         | Nivel 1        | Nivel 2 |            |             |
| B Nixtamalización       | 315.57         | 132.91  |            | N-2: 20 min |
| D Desengrasado          | 162.53         | 285.94  |            | N-1: No     |
| Media                   | 224.24         |         | 1          |             |

*g.l.* = grados de libertad

$$\mu_{(B2, D1)} = \bar{B}_2 + \bar{D}_1 - g.l. (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(B2, D1)} = 132.91 + 162.53 - 1 (224.24)$$

$$\mu_{(B2, D1)} = 295.44 - 224.24$$

$$\mu_{(B2, D1)} = 71.20 \quad \text{Menor producción de ácido butírico, mg/Kg}$$

Los contenidos iniciales de diacetilo en los medios de cultivo (Cuadro 38) fueron más elevados que los observados en los cultivos mixtos en medios de almidón (Cuadro 32). Ambos sistemas fueron añadidos con las mismas concentraciones de extracto de levadura y se inocularon de manera similar, por lo que se deduce que la masa fue una fuente importante de este compuesto. La nixtamalización pudo influir en la liberación de éste y otros metabolitos de la fracción lipídica del maíz; porque las masas sin fermentar preparadas con un período de nixtamalización de 5 min tuvieron en general, contenidos de diacetilo inferiores a las nixtamalizadas durante 20 min. Además, el diacetilo no ha sido detectado en cultivos a base de maíz no - nixtamalizado, con cepas lácticas incapaces de producir ese metabolito (Nsofor *et al.*, 1992).

Los pretratamientos del maíz originaron medios de cultivo diversos, cuya composición y consistencia determinaron que las bacterias lácticas produjeran cantidades variables de diacetilo durante la fermentación. Las concentraciones de diacetilo alcanzadas al término de la fermentación también se muestran en el Cuadro 38. El cultivo que produjo más diacetilo (1 235.32 mg/Kg) se realizó con la masa preparada en el Exp # 5, en el que también se consumieron más azúcares reductores. En ese experimento se alcanzó un contenido final de diacetilo de 2 671.17 mg/Kg, superando al valor acumulado en los cultivos de almidón, 134.76 mg/l. Es interesante comparar estos valores con el producido en el ghee (crema láctea fermentada y clarificada), que fue apenas de 2.89 mg/Kg (Yadav y

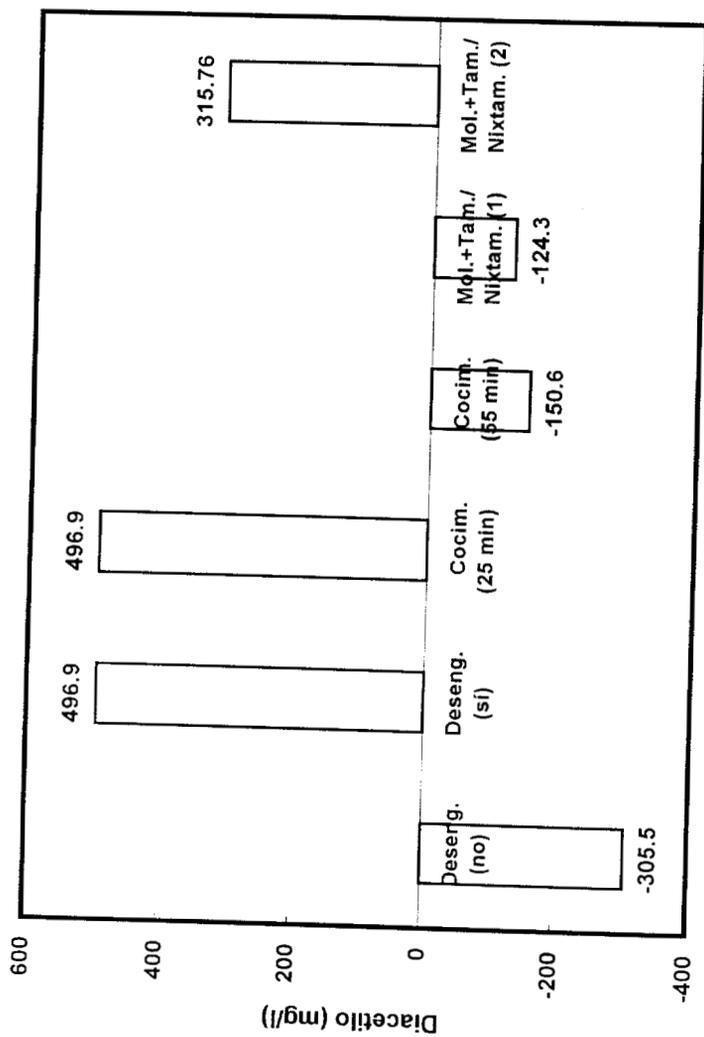
Srinivasan, 1985); o con el máximo acumulado en el yoghurt de soya, que fue de 0.08 mg/Kg (Granata y Morr, 1996; Nsofor *et al.*, 1992).

La producción de diacetilo (Cuadro 39) fue la variable de respuesta en el tratamiento estadístico de Taguchi (Ross, 1989). Los resultados del análisis de varianza que se aplicó se muestran en el Cuadro 44, de acuerdo al cual, se deduce que los factores significativos para la producción de diacetilo fueron: el desengrasado ( $P < 0.05$ ), el cocimiento ( $P < 0.05$ ), la nixtamalización ( $P < 0.1$ ), y la interacción de la última con la molienda + tamizado ( $P < 0.1$ ). En el Cuadro 44 se observa que la contribución porcentual conjunta de estos factores, explicó el 92.45% del total de los efectos en la producción del diacetilo. Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de diacetilo) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 19. En el Cuadro 45 se observa que los niveles recomendados de estos factores fueron: la nixtamalización por 5 min, la molienda + tamizado dando una harina de partícula gruesa ( $>$  malla 40, ó 0.42 mm), el desengrasado y el cocimiento por 25 min. Con la ecuación de estimación de medias se calculó la concentración teórica estimada de producción de diacetilo, que fue de 1145.8 mg/Kg.

**Cuadro 44**  
**Análisis de varianza y contribución porcentual de la 1ª serie de cultivos en maíz (A.O. L8).**  
**Efecto de las operaciones de pretratamiento de maíz en la producción de diacetilo**

| Fuente variación /<br>Columna : factor | <i>g.f.</i> <sup>a)</sup> | Varianza  | F c/ error<br>Confundido | Significancia <sup>b)</sup> y factor | Contribución<br>P (%) |
|--|---------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 : A=Mol+Tam                          | 1                         | 344441.9  |                          |                                      | 9.1                   |
| 2 : B=Tiem Nixt.                       | 1                         | 266452.6  | 11.640                   | *Nixtamalización                     | 14.1                  |
| 3 : A x B                              | 1                         | 387301.8  | 16.920                   | *Mol. + Tam / Nixt                   | 18.1                  |
| 4 : C=Cocim.                           | 1                         | 485398.9  | 21.205                   | **Cocimiento                         |                       |
| 5 : A x C                              | 1                         | 11338.7   |                          |                                      |                       |
| 6 : B x C                              | 1                         | 110420.3  | 4.824                    |                                      |                       |
| 7 : D=Deseng.                          | 1                         | 1287788.6 | 56.259                   | **Desengrasado                       | 51.2                  |
| <b>TOTAL:</b>                          | 7                         |           |                          |                                      | 100                   |
| <b>error confundido</b>                | 2                         | 22890.3   |                          |                                      |                       |
| <b>P factores Signif.</b>              |                           |           |                          |                                      | 92.5                  |
| <b>P residual</b>                      |                           |           |                          |                                      | 7.5                   |

a) *g.f.* = grados de libertad.  
 Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01.  
 $F_{Tb}^*$  (1, 2) = 8.53  
 $F_{Tb}^{**}$  (1, 2) = 18.50  
 $F_{Tb}^{***}$  (1, 2) = 93.50



### Factores significativos (nivel)

Fig. 19 Factores significativos para la producción de diacetilo en cultivos mixtos. 1ª serie de maíz

**Cuadro 45**  
**Ecuación de estimación de medias de la 1ª serie de cultivos en maíz. Efecto de las operaciones de pretreamiento de maíz en la producción de diacetilo**

| Factores Significativos             | Medias (g/Kg) |         | g./ (n-1) | Niveles                                    |
|-------------------------------------|---------------|---------|-----------|--|
|                                     | Nivel 1       | Nivel 2 |           |  |
| D Desengrasado                      | -305.48       | 496.95  |           | N-2: Sí                                    |
| C Cocimiento                        | 496.95        | -150.59 |           | N-1: 25 min                                |
| A x B Mol. + Tam. / nixtamalización | -124.30       | 315.76  |           | N-2: Mol. + Tam: Malla > 40 / Nixt.: 5 min |
| B Nixtamalización                   | 278.23        | -86.77  |           | N-1: 5 min                                 |
| Media                               | 95.73         |         | 3         |  |

g./ = grados de libertad

$$\mu_{(B1, A-B2, C1, D2)} = \bar{B}_1 + \bar{A} - \bar{B}_2 + \bar{C}_1 + \bar{D}_2 - g./ (\mu_{Tot.})$$

$$\mu_{(B1, A-B2, C1, D2)} = 278.2 + 315.8 + 342 + 497 - 3 (95.73)$$

$$\mu_{(B1, A-B2, C1, D2)} = 1433 - 287.2$$

$$\mu_{(B1, A-B2, C1, D2)} = 1145.8 \quad \text{Diacetilo producido, mg/Kg}$$

*Selección de las condiciones de pretratamiento.* Las operaciones de pretratamiento de maíz influyeron en la composición y estructura física de las masas, que fueron posteriormente fermentadas en idénticas condiciones. Se determinaron los efectos de esos pretratamientos en la producción de diacetilo, de ácido láctico y de ácido butírico por las bacterias lácticas, al utilizar esas masas. Sin embargo, las condiciones que influyeron en la formación de cada producto no fueron siempre las mismas, los criterios de selección de las condiciones de pretratamiento de maíz definitivas fueron: la producción de diacetilo y obtener un producto que tuviera características de composición y apariencia aceptables, considerando que se deseaba elaborar una masa aromatizada para la industria alimentaria. La selección se basó en los datos del Cuadro 46, que presenta un resumen del análisis estadístico realizado a las tres variables de respuesta.

La nixtamalización del maíz incrementa la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático debido a su gelatinización parcial (Choto *et al.*, 1985). Por otro lado, una nixtamalización ligera, por ejemplo. 5 min, conserva mejor el contenido de los azúcares simples en el maíz, los que a su vez, favorecen muchas de las actividades de los microorganismos que se nutren de él. El efecto de la presencia de glucosa en la fermentación ya se había detectado en los cultivos axénicos en almidón. Por esta razón, la nixtamalización corta (5 min) fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) para la formación de ácido láctico, pero tuvo significancia baja para la producción de diacetilo ( $P < 0.1$ ).

**Cuadro 46**  
**Resumen del análisis estadístico de la 1ª serie de cultivos en maíz.**  
**Efecto de las operaciones de pretratamiento de maíz en el cultivo**

| Factores e interacciones significativas     | Niveles seleccionados (a) <sup>(b)</sup> para      |   |   |
|---|--|---|---|
|   | Producción de Ác. láctico 8.77 g/Kg <sup>(c)</sup> | Menor Prod. de Ác. Butírico 71.2 mg/Kg <sup>(c)</sup> | Producción de diacetilo 1146 mg/Kg <sup>(c)</sup> |
| Nixtamalización (min)                       | 5 (57.2) ***                                       | 20 (62.2) **  | 5 (9.1) *   |
| Cocimiento (min)                            | —  | —   | 25 (18.1) **                                      |
| Desengrasado                                | Si (14) **   | No (24.9) *   | Si (51.2) **                                      |
| Molienda + tamizado / Nixt. (# malla / min) | > 40 / 5 (12.8) **                                 | —   | > 40 / 5 (14.1) *                                 |

a) Contribuciones porcentuales al efecto total, % b)

b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01.

c) Valores teóricos calculados con las ecuaciones de estimación de medias.

La producción de menos ácido butírico por las bacterias lácticas también parece haber dependido del menor contenido de azúcares reductores en el medio, cuando éste fue preparado con el nixtamal más cocido (20 min). La pérdida de azúcares reductores durante una nixtamalización prolongada se ha atribuido en parte a su solubilidad en el agua de lavado (Bressani *et al.*, 1990) y también a su descomposición por efecto del ambiente alcalino (Fennema, 1982). Como algunos de los objetivos del trabajo consistían en evitar la formación de niveles objetables de olores (exceso de ácido butírico y otros A.G.V.) y de sabores (acidez excesiva), se seleccionó el nivel 2 de la nixtamalización (20 min). Este nivel podría causar una ligera reducción en la producción de diacetilo, pero así se puede obtener una masa para la industria alimentaria con un mejor balance en el aroma y en el sabor.

La intensidad de la nixtamalización es capaz de modificar la eficiencia del secado, porque durante el calentamiento se forma una coraza de almidón gelatinizado parcialmente, dificultando la formación de microporos necesarios para la difusión de agua (López y Segurajaúregui, 1986); ésto origina una masa con una conductividad térmica mayor que si no estuviera gelatinizada (Marousis *et al.*, 1991). El secado del harina se realizó con el fin de reducir el tamaño de partícula durante la molienda seca, y poder estandarizar su tamaño a valores que no se alcanzarían con una molienda húmeda. Durante el secado debe alcanzarse una humedad menor a 23%, pues según Marousis *et al.* (1991), los gránulos de almidón de maíz con contenidos de humedad mayores se deforman notablemente y no se fracturan. La humedad en este trabajo disminuyó hasta un valor de 12%.

Se seleccionó el nivel 1 de la molienda + tamizado (< malla # 40, ó < 0.42 mm) debido a que se planeaba producir una masa aromatizada fina, con potencial para ser materia prima en la industria alimentaria. Considerando el resumen del análisis estadístico del Cuadro 46 se seleccionó un tiempo de nixtamalización de 20 min, por lo que el tamaño de partícula pequeño no afectó a las producciones de ácido láctico y diacetilo. Cuando Akingbala *et al.* (1987) fermentaron maíz no nixtamalizado, observaron el efecto positivo de la molienda en la acidificación, pues el daño mecánico del grano aumentó la disponibilidad de los nutrientes.

El desengrasado del harina fue parcial, pues aún se detectaron contenidos de A.G.V. en todos los medios de cultivo iniciales. Sin embargo, con sistemas de extracción más eficientes, podrían reducirse aún más. La aplicación de esta operación incrementó las producciones de ácido láctico y de diacetilo ( $P < 0.05$ ), pero no fue recomendable para evitar la formación de ácido butírico durante la fermentación ( $P < 0.1$ ). Estos efectos se explican si se considera que los ácidos grasos libres en el medio de cultivo son potentes inhibidores para la actividad de las bacterias lácticas, incluyendo a *Lb. acidophilus* y *Pd acidilactici*, especie muy cercana a *Pd. pentosaceus* (Bucker *et al.*, 1979, Yadav y Srinivasan, 1985). Se decidió desengrasar el harina de maíz para favorecer la producción de diacetilo. Un beneficio adicional del desengrasado es que al reducir la fase oleosa de los alimentos, el vapor de presión de los compuestos volátiles se incrementa, aumentando probablemente su intensidad sensorial, aunque el diacetilo es un

compuesto hidrosoluble, su volatilidad puede incrementarse 50% al eliminar 20% de grasa (Schirle *et al.*, 1994).

El cocimiento del harina se realizó en principio, con los objetivos de reducir la flora microbiana de acompañamiento y de disminuir el olor y sabor a masa cruda. El nivel seleccionado de cocimiento fue el período de 25 min por haber resultado significativo para la producción de diacetilo ( $P < 0.05$ ). El cocimiento del harina de maíz, además de gelatinizar el almidón, aumenta su capacidad de absorción de agua reduciendo la viscosidad relativa del medio y mejora la digestibilidad de la proteína en relación al harina sin cocimiento (Adeyemi *et al.*, 1989). Al alterar las proteínas y volatilizar el sulfuro de dimetilo del germen, se disminuye el sabor y el aroma a maíz crudo (Huang y Zayas, 1996). La pérdida de los compuestos sulfurados mejora también la calidad de medio de cultivo, pues estos compuestos son inhibitorios para las bacterias lácticas (Patel *et al.*, 1980).

*Conclusiones.* Las condiciones de pretratamiento de maíz seleccionadas fueron: nixtamalización de 20 min; molienda y tamizado del harina hasta obtener un tamaño de partícula menor a 0.42 mm (malla 40); desengrasado con hexano y cocimiento durante 25 min. Como no fueron evaluadas otras operaciones de pretratamiento del maíz, sus condiciones permanecen como se establecieron inicialmente.

Con la masa de maíz preparada siguiendo el procedimiento previamente indicado, el siguiente objetivo fue evaluar la influencia de algunas condiciones de cultivo que no habían sido estudiadas previamente en los sistemas a base de almidón. Con este fin, se diseñó una 2ª serie de experimentos con medios semisólidos a base de maíz.

## 2ª SERIE. EFECTO DEL EXTRACTO DE LEVADURA Y DE LA INOCULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE DIACETILO.

El objetivo de esta serie fue estudiar el efecto del extracto de levadura y del inóculo en la producción de diacetilo. A diferencia de los medios de cultivo más simples a base de almidón, los preparados con maíz constituyen una fuente muy compleja de nutrientes, por lo que era importante determinar si con esa composición se cubrían los requerimientos de las bacterias lácticas para producir diacetilo, o si debían complementarse con extracto de levadura. Por otro lado, al preparar los medios de cultivo a base de maíz se utilizaron operaciones de pretratamiento usuales en la industria alimentaria, originando masas semisólidas con una carga microbiana reducida; estas masas fueron la base para iniciar cultivos heterogéneos inoculados con bacterias lácticas. Por lo tanto, también se evaluaron los efectos del inóculo sobre la producción del diacetilo.

En la 2ª serie de cultivos se estudió el efecto de tres factores en la producción de diacetilo: **extracto de levadura, relación entre las cepas y tamaño de inóculo**, cada uno con dos niveles. El diseño se muestra en el Cuadro No. 7. Estos factores y sus interacciones se introdujeron en el A.O. L8 de Taguchi (Ross,1989) que se muestra en el Cuadro 8, de acuerdo al diseño de la gráfica lineal de la Fig. 6. Todos los medios de cultivo semisólido fueron preparados en las siguientes condiciones: nixtamalización por 20 min; molienda húmeda; secado a 60°C; desengrasado parcial; molienda seca y tamizado por malla 40, cocimiento durante 25 min, adición de CaCO<sub>3</sub> al 0.03 % y ajuste de humedad a 78%. La incubación se realizó a 32°C, durante 5 días. Los análisis físicos y químicos que se realizaron a los tiempos 0 y 5 días de cultivo fueron: la determinación de humedad, carbohidratos totales, azúcares reductores, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, diacetilo, pH, potencial eléctrico (Eh) y actividad de agua (a<sub>w</sub>).

Los inóculos fueron caldos de cultivo axénicos de 36 h en medio a base de glucosa, en volúmenes determinados para proporcionar las cuentas viables de cada cepa (Anexo 3), según el diseño.

Un resumen de los resultados de los análisis aplicados a los cultivos a base de maíz se presenta en el Cuadro 47, donde se indica también el error experimental de cada parámetro en la serie por medio del cálculo de  $\bar{C}$ .  $\bar{V}$ .

Cuadro 47

Resumen de los datos analíticos de la 2ª serie de cultivos en maíz. Efecto del Ext. Lev. y del inóculo en el cultivo

| Parámetros analizados | Iniciales<br>(Mín. / Máx.) | Finales<br>(Mín. / Máx.) | C. V. <sup>a)</sup><br>(%) | Mayor cambio <sup>b)</sup> |           |  |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|--|
|                       |                            |                          |                            | valor<br>(Fin. - Ini.)     | #<br>Exp. | Factores   |
| Humedad (%)           | 78.03 / 78.60              | 78.02 / 78.57            | 0.30                       | -0.03                      | 6         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E6<br>Rel. de Cepas, 1:1 |
| Carb. Tot. (g/Kg)     | 142.73 / 207.20            | 139.77 / 173.66          | 2.49                       | -55.09                     | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1 |
| Azúc. Red. (g/Kg)     | 1.36 / 2.16                | 1.07 / 1.37              | 0.56                       | -0.78                      | 8         | Extr. Lev. 0.2<br>Conc. Biom. 2E6<br>Rel. de Cepas, 3:1  |
| Almidón (g/Kg)        | 140.98 / 205.30            | 138.68 / 171.50          | --                         | -54.80                     | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1 |
| Ác. láctico (g/Kg)    | 0.08 / 0.15                | 2.13 / 2.37              | 3.16                       | 2.28                       | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1 |
| pH                    | 6.20 / 6.88                | 4.59 / 4.78              | 0.56                       | -2.16                      | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1 |
| Eh (mv)               | 218.00 / 238.00            | 177.50 / 226.50          | 1.07                       | -46.00                     | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1 |
| aw                    | 0.998 / 1.00               | 0.995 / 0.997            | 0.03                       | -0.005                     | 3         | Extr. Lev., 0<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 3:1   |
| Ác. Acét. (mg/Kg)     | 110.38 / 228.58            | 154.40 / 458.76          | 3.96                       | 346.12                     | 7         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 1:1 |
| Ác. Prop. (mg/Kg)     | 94.69 / 140.18             | 126.00 / 212.64          | 5.98                       | 102.41                     | 5         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 1:1 |
| Ác. But. (mg/Kg)      | 273.55 / 553.16            | 312.67 / 787.37          | 3.99                       | 359.06                     | 5         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E5<br>Rel. de Cepas, 1:1 |
| Diácetilo (mg/Kg)     | 594.58 / 1295.41           | 787.31 / 1604.22         | 3.51                       | 311.60                     | 8         | Extr. Lev., 0.2<br>Conc. Biom. 2E6<br>Rel. de Cepas, 3:1 |

a) Promedio de los coeficiente de variación por parámetro, calculado con los C. V. de cada experimento: C. V. = (Desv. Est./Prom.) • 100

b) Datos del experimento que presentó el mayor cambio en la serie, después de la fermentación

Todos los medios fueron semisólidos y homogéneos. Al término de la fermentación, la consistencia de los cultivos había cambiado a un fluido espeso, y tenía un suave aroma tipo mantequilla, a pesar de que la humedad se mantuvo constante desde el inicio al final de la fermentación a 78%. No se presentó sinéresis en ningún caso.

La adición de extracto de levadura al medio afectó el consumo de los carbohidratos totales. En los medios enriquecidos hubo una disminución entre 18.83 y 55.09 g/Kg, mientras que el máximo consumo en los medios sin el extracto de levadura fue de 3.19 g/Kg. El cultivo que presentó el mejor consumo de carbohidratos totales, además de tener extracto de levadura, fue inoculado con una cuenta bacteriana de  $2 \times 10^5$  U.F.C./g de masa, con una proporción de 3:1 entre *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*.

Los contenidos de azúcares reductores en los medios de cultivo fueron muy bajos y homogéneos, aunque los valores finales fueron menores en todos los casos (Cuadro 47). El mayor consumo se observó en el cultivo realizado con los niveles altos de los tres factores evaluados.

En ausencia del extracto de levadura, los consumos de almidón (diferencia entre concentración de carbohidratos totales y azúcares reductores) fueron muy bajos; por lo que se deduce que la actividad amilolítica de las bacterias lácticas fue estimulada por este aditivo. El mejor consumo, 54.8 g/Kg, se presentó en el Exp. 7, coincidiendo con el señalado para carbohidratos totales.

La mayor producción de ácido láctico fue de 2.3 g/Kg (Cuadro 47). Esta producción tan baja pudo deberse a que hubo poca glucosa en el medio. Esto mismo permitió observar el efecto del extracto de levadura en la producción de ácido láctico. Como un antecedente, se sabe que el extracto de levadura es estimulante de la acidificación en las fermentaciones lácticas (Berg *et al.*, 1981, Tamime y Deeth, 1980). La disminución de pH en los cultivos fue en consecuencia, relativamente homogénea, alcanzando valores finales alrededor de 4.6 (Cuadro 47). En el sekete, que es un alimento a base de maíz fermentado por diversas especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, se alcanza una concentración de ácido láctico de 4.3 g/Kg y un pH de 4.2 (Adegoke *et al.*, 1995). En este cultivo se llevó a cabo un control parcial de pH con la adición de CaCO<sub>3</sub>, ya que las enzimas involucradas en la biosíntesis del diacetilo por diversas bacterias lácticas presentan su máxima actividad a valores de pH de 4.8 a 5.4 (Cogan *et al.*, 1984, Klaver *et al.*, 1992). Debido a estas razones se optó por un control parcial en los cultivos a base de maíz.

En la serie de cultivos presente, se realizaron determinaciones de parámetros nuevos, como: el potencial eléctrico (Eh) y la actividad de agua (a<sub>w</sub>) de las masas iniciales y finales, cuyos valores se muestran en el Cuadro 47. El valor de Eh disminuyó entre -7 a -46 mv; pero en ningún caso se observó un potencial negativo, como podría esperarse en la producción de ácido láctico (Akashi *et al.*, 1978); pues el valor mínimo fue aproximadamente de 170 mv. La mayor disminución de Eh se observó en el Exp. 7, cuando se adicionó extracto de levadura y se inoculó con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus*, en una proporción de 3:1 y un nivel de  $2 \times 10^5$  U.F.C./g.

Las determinaciones de Eh se han propuesto como un parámetro de medición y control en los cultivos que tienen concentraciones de oxígeno disuelto muy bajas para ser medidas con un electrodo de oxígeno (Ishizaki *et al.*, 1974). Los niveles medios de Eh son favorables para la producción y estabilidad del diacetilo, pues cultivos de leche fermentada tipo buttermilk que fueron aireados antes de ser almacenados, conservaron mejor los contenidos de diacetilo que los sometidos a condiciones de anaerobiosis; este efecto fue atribuido a la transformación de diacetilo en acetoína por la enzima diacetil reductasa, en condiciones reducidas (Klaver *et al.*, 1992). Las actividades microbianas pudieron influir también en el valor de Eh durante la fermentación, p.e. *Lactobacillus acidophilus* es capaz de formar pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y como *Pediococcus pentosaceus* excreta una enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido en oxígeno molecular y agua (Verde *et al.*, 1995), entonces el valor de Eh permanece elevado. La presencia de oxígeno en medios de glucosa origina que algunas bacterias lácticas formen un exceso de piruvato intracelular, derivando en una mayor biosíntesis de compuestos relacionados con el diacetilo (Cogan *et al.*, 1989). Los valores de Eh de la fermentación que se establece de manera natural en harina de maíz fluctuaron entre 100 y 400 mv (Fields *et al.*, 1981).

Los valores de actividad de agua fueron muy elevados en todas las masas, antes y después de la fermentación ( $a_w > 0.99$ ). Existía la duda de que al tratarse de un cultivo semisólido (humedad aproximada: 78%), el valor de  $a_w$  pudiera bajar de un valor de 0.98, nivel inhibitorio para otras bacterias lácticas, como *Lactococcus*

*lactis* ssp. *lactis* biov. *diacetylactis* (Bassit et al., 1993), pero los datos presentes indican que hay una elevada disponibilidad de agua para el metabolismo microbiano. Los valores de  $a_w$  obtenidos son congruentes con los de la isoterma de humedad del harina de nixtamal, que se determinaron por Carrillo et al. (1989), según. De acuerdo a estos resultados, la masa de nixtamal con humedad relativamente baja, presenta valores de  $a_w$  muy elevados (Hum.: 35% y  $a_w$ : 0.98).

La producción de ácido acético (Cuadro 47) sí fue influenciada por las distintas condiciones de cultivo; pues los cultivos que fueron inoculados con más *Pd. pentosaceus* y/o enriquecidos con extracto de levadura, produjeron más ácido acético. El cultivo que presentó el valor máximo de producción fue inoculado con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* en una relación de 3:1, dando una cuenta inicial total de  $2 \times 10^5$  U.F.C./g de masa, y tuvo adición de extracto de levadura (Exp. 7). En los cultivos axénicos en medios a base de almidón se había determinado que *Pd. pentosaceus* producía niveles notables de ácido acético. Borch et al. (1991) determinaron que la presencia de oxígeno y la baja concentración de glucosa pueden inducir en algunas bacterias homolácticas un metabolismo heteroláctico. En esta serie el contenido de glucosa fue siempre bajo y como el metabolismo de las bacterias láctica estaba produciendo oxígeno molecular, se pudieron presentar las condiciones para incrementar el contenido de ácido acético.

Todos los cultivos de la serie formaron ácidos propiónico y butírico (Cuadro 47), pero no se evidenció una influencia específica de los factores en su producción. El cultivo que formó más cantidad de ambos ácidos fue adicionado con extracto de levadura, y se inoculó en el nivel de  $2 \times 10^5$  U.F.C./g de masa, con una relación de cepas de 1:1 (Exp. 5).

Los datos iniciales y finales de concentración de diacetilo de la serie se presentan en el Cuadro 47. La mejor producción de diacetilo en esta serie fue de 311.60 mg/l, que es superior a los valores observados en los productos lácteos, como en el queso cheddar, con 20 mg/Kg (Dacremont y Vickers, 1994); en el yoghurt, con 0.1 - 13 mg/Kg (Tamime y Deeth, 1980); o en la leche tipo buttermilk, con 4.6 mg/l (Vasavada y White, 1979). No obstante, los valores de producción de diacetilo de esta serie fueron más bajos que los de la 1ª serie de maíz (máximo: 1235.32 mg/l), debido posiblemente a que los medios de cultivo de la 2ª serie tenían una menor concentración de azúcares reductores. El efecto de los carbohidratos simples en ese metabolismo ha sido notorio en todos los cultivos realizados en este trabajo. En otros medios, como los productos lácteos, vinos, cerveza, etc. donde el redox es bajo y la fuente de diacetilo es el citrato, la presencia de glucosa inhibe la producción de diacetilo, debido al exceso de ATP acumulado (Cogan *et al.*, 1984; Marshall, 1987); si estos sistemas son adicionados con sacarosa o jarabe de maíz fructosado, tampoco se incrementa la producción de diacetilo (McGregor y White, 1987). Sin embargo, Kaneko *et al.* (1990) observaron que algunas especies de la familia *Streptococcaceae* fueron capaces de producir diacetilo hasta 103 mg/l (valor

excepcional para esta especie) cuando se desarrollaron en medios con exceso de glucosa, siempre y cuando el citrato haya estado ausente y el redox haya sido alto. En los cultivos de maíz de este trabajo el redox fue elevado y no había citrato, por lo que el consumo de glucosa fue favorable y no inhibitorio para la formación de diacetilo.

Los datos de producción de diacetilo de cada experimento en la presente serie se muestran en el Cuadro 48. Estos datos fueron la variable de respuesta en el análisis de varianza de Taguchi mostrado en el Cuadro 49. De estos resultados se dedujo que la adición de extracto de levadura tuvo una alta significancia ( $P < 0.01$ ) en la producción de diacetilo, en tanto que la relación entre cepas al inicio del cultivo tuvo una influencia menor ( $P < 0.1$ ). Entre ambos factores, se expresó el 90.88% de los efectos en la producción de diacetilo (Cuadro 49). La concentración inicial de biomasa no influyó significativamente entre los parámetros evaluados. Los valores promedio de la variable de respuesta (producción de diacetilo) calculados con los resultados de los experimentos de cada nivel de los factores significativos se muestran en la Fig. 20. El Cuadro 50 muestra los mejores niveles de cada factor para la producción de diacetilo, que fueron: la adición de extracto de levadura (0.2 %) y la relación entre *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* de 3:1. El valor calculado con la ecuación de estimación de medias (307 mg/Kg) fue similar a la mejor producción de la serie, que fue de 309 mg/Kg (Cuadro 48), el cual fue iniciado con una cuenta viable total de  $2 \times 10^6$  U.F.C./g de masa y las demás condiciones seleccionadas en el tratamiento estadístico.

Cuadro 48

Variable de respuesta para el análisis estadístico de la 2ª serie de cultivos en maíz.  
Efecto del extracto de levadura y del inóculo en la producción de diacetilo

| No. Experimento | Factores                                       | Diacetilo producido ( mg/Kg ) |
|-----------------|--|-------------------------------|
| 1               | Ext. Lev., 0, Conc. biom. 2E5 Rel. cepas, 1:1  | 156.59                        |
| 2               | Ext. Lev., 0 Conc. biom. 2E6 Rel. cepas, 1:1   | 177.39                        |
| 3               | Ext. Lev., 0 Conc. biom. 2E5 Rel. cepas, 3:1   | 223.39                        |
| 4               | Ext. Lev., 0 Conc. biom. 2E6 Rel. cepas, 3:1   | 193.46                        |
| 5               | Ext. Lev., 0.2 Conc. biom. 2E5 Rel. cepas, 1:1 | 243.47                        |
| 6               | Ext. Lev., 0.2 Conc. biom. 2E6 Rel. cepas, 1:1 | 308.80                        |
| 7               | Ext. Lev., 0.2 Conc. biom. 2E5 Rel. cepas, 3:1 | 294.93                        |
| 8               | Ext. Lev., 0.2 Conc. biom. 2E6 Rel. cepas, 3:1 | 311.60                        |

**Cuadro 49**  
**Análisis de varianza y contribución porcentual de la 2ª serie de cultivos en maíz (A.O. L8).**  
**Efecto del extracto de levadura y del inóculo en la producción de diacetilo**

| Fuente variación /<br>Columna: factor | <i>g.l.</i> <sup>a)</sup> | Varianza | F directo | F c/ error<br>confundido | Significancia <sup>b)</sup><br>y factor | Contribución<br>P (%) |
|---------------------------------------|---------------------------|----------|-----------|--------------------------|---|-----------------------|
| <b>1 : A=Ext. Lev.</b>                | 1                         | 20804.55 | 38901.76  | 59.08                    | *** Ext. Lev.                           | 85.29                 |
| <b>2 : B=Rel.Cepas</b>                | 1                         | 2350.38  | 4394.91   | 6.67                     | * Rel. cepas                            | 5.59                  |
| <b>3 : A x B</b>                      | 1                         | 391.90   | 732.79    |                          |   |                       |
| <b>4 : C=Conc. Biom.</b>              | 1                         | 663.96   | 1241.53   |                          |   |                       |
| <b>5 : A x C</b>                      | 1                         | 1038.14  | 1941.18   | 2.95                     |   |                       |
| <b>6 : B x C</b>                      | 1                         | 1235.19  | 2309.65   | 3.51                     |   |                       |
| <b>7 : error</b>                      | 1                         | 0.53     |           |                          |   |                       |
| <b>TOTAL:</b>                         | 7                         |          |           |                          |   | 100                   |
| <b>error confundido</b>               | 4                         | 352.13   |           |                          |   |                       |
| <b>P factores Significativos</b>      |                           |          |           |                          |   | 90.88                 |
| <b>P residual</b>                     |                           |          |           |                          |   | 9.12                  |

a) *g.l.* = grados de libertad.

b) Niveles de significancia: \*P < 0.1; \*\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.01

F<sub>Tb</sub>\* (1, 3) = 5.54

F<sub>Tb</sub>\*\* (1, 3) = 10.10

F<sub>Tb</sub>\*\*\* (1, 3) = 34.10

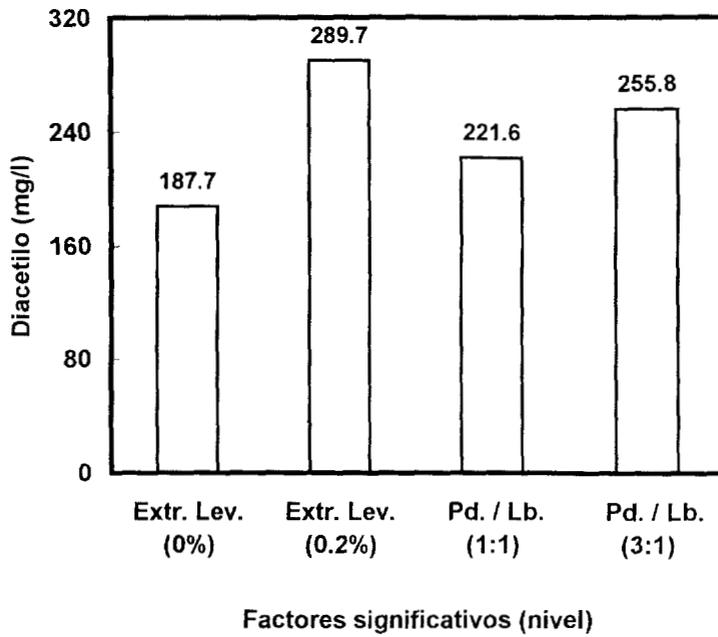


Fig. 20 Factores significativos para la producción de diacetilo en cultivos mixtos. 2ª serie de maíz

**Cuadro 50**  
**Ecuación de estimación de medias de la 2ª serie de cultivos en maíz.**  
**Efecto del extracto de levadura y del inóculo en la producción de diacetilo**

| Factores<br>Significativos    | Medias (mg/Kg) |         | g. l.<br>(n-1) | Niveles  |
|-------------------------------|----------------|---------|----------------|--|
|                               | Nivel 1        | Nivel 2 |                |  |
| <b>A</b> Extracto de levadura | 187.71         | 289.70  |                | N-2: Extracto de levadura, 0.2 %                           |
| <b>B</b> Relación entre cepas | 221.56         | 255.85  |                | N-2: <i>Pd. pentosaceus</i> : <i>Lb. acidophilus</i> ; 3/1 |
| Media                         | 238.71         |         | 1              |  |

g.l. = grados de libertad

$$\mu_{(A_2, B_2)} = \bar{A}_2 + \bar{B}_2 - g.l. (1^{ra})$$

$$\mu_{(A_2, B_2)} = (289.7 + 255.85) - 238.7$$

$$\mu_{(A_2, B_2)} = 545.55 - 238.71$$

$$\mu_{(A_2, B_2)} = 306.84 \quad \text{Diacetilo producido, mg/Kg}$$

El dhokla es un alimento hindú a base de cereal y crema con olor a mantequilla (Joshi *et al.*, 1989). Con el objetivo de comparar el balance de los principales compuestos relacionados con el aroma y sabor producidos en la masa de maíz del Exp. 8, con la mejor pasta fermentada del dhokla evaluada en un análisis sensorial, se calcularon los siguientes cocientes, después de unificar unidades: A.G.V. totales / ácido láctico: 0.438: 0.505 y diacetilo / ácido láctico: 0.437: 0.005 (Exp. 8 en maíz y cultivo de dhokla, respectivamente). De estos valores se deduce que por cada gramo de ácido láctico formado, se produjeron cantidades semejantes de A.G.V. en los dos alimentos; pero en la pasta fermentada de maíz, la relación de diacetilo fue casi 100 veces mayor que la del dhokla. Por lo tanto, el producto de maíz guarda el balance recomendado entre los A.G.V. y su respectiva acidez, en tanto que se destaca por su elevada producción de diacetilo.

*Selección de las condiciones de cultivo.* El extracto de levadura pudo enriquecer a los medios preparados a base de maíz, favoreciendo la producción de diacetilo. Este efecto positivo había sido demostrado previamente en los cultivos axénicos de almidón con *Pd. pentosaceus*; además de que también en esos cultivos hubo un notable consumo de almidón. Se ha considerado al maíz como un medio de cultivo que proporciona todos los nutrientes que requieren las bacterias lácticas amilolíticas para su crecimiento y producción de ácido láctico (Hamad y Fields, 1979, Mercier *et al.*, 1992). Granata y Morr (1996) han observado que al enriquecer al maíz con péptidos pequeños y algunos

cofactores, se estimula el crecimiento microbiano y la formación de diacetilo, por eso el extracto de levadura favoreció la producción de diacetilo en esta serie.

La relación de cepas seleccionada con un nivel de significancia de  $P < 0.10$ : *Pd. pentosaceus* / *Lb. acidophilus*, 3:1, señala que las actividades metabólicas del pediococo fueron más importante para producir diacetilo que las del bacilo. Se puede asumir que la utilización del almidón en los cultivos a base de maíz fue llevada a cabo por las dos cepas, pues en los cultivos axénicos a base de almidón se demostró que *Lb. acidophilus* era el más amilolítico. La producción del diacetilo, por otro lado, se atribuye únicamente al metabolismo de *Pd. pentosaceus*. Algunas enzimas relacionadas con la biosíntesis de diacetilo son inhibidas por la presencia de  $H_2O_2$  (Kaneko *et al.*, 1990), pero *Pd. pentosaceus* produjo una pseudocatalasa que pudo probablemente proteger ese metabolismo. A *Lb. acidophilus* no se le atribuye importancia en el aroma, aunque cepas de esta especie se han utilizado para enmascarar el aroma herbal del yoghurt de soya, probablemente por alguna acción sobre los lípidos (Mital y Steinkraus, 1976).

Yadav y Srinivasan (1985) atribuyeron el aumento en la producción de diacetilo en medios a base de crema láctea, al incremento de tamaño del inóculo de bacterias lácticas de 1 a 3 %. En el presente estudio, la adición de  $CaCO_3$  al medio de cultivo pudo proteger la eficiencia de producción del ácido láctico y de algunos compuestos aromatizantes en los cultivos con menor cuenta viable inicial, de manera semejante al comportamiento observado en los cultivos de algunas bacterias lácticas que fueron adicionadas de  $CO_2$  (Louaileche *et al.*, 1993).

*Conclusiones.* Las condiciones de cultivo en medios a base de maíz seleccionadas fueron: concentración de extracto de levadura en el medio: 0.2 %; cuenta viable total al inicio de la fermentación:  $2 \times 10^6$  U.F.C./g de medio de cultivo y relación de las cepas: *Pd. pentosaceus* / *Lb. acidophilus*, 3:1. Otras condiciones de cultivo habían sido seleccionadas previamente en los cultivos a base de almidón.

Habiendo determinado las condiciones de pretratamiento de maíz y las de cultivo para la producción de diacetilo en el producto; el siguiente objetivo fue determinar los perfiles de producción de diacetilo y de otros parámetros importantes relacionados con ese metabolismo. Con este fin, se llevó a cabo un cultivo en medios semisólidos a base de maíz, en las condiciones seleccionadas.

**CINÉTICA DE FERMENTACIÓN EN UN CULTIVO MIXTO A BASE DE MAÍZ  
CON *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus acidophilus*.**

Se realizaron dos cultivos en medios de maíz utilizando las condiciones previamente seleccionadas para determinar la cinética de la fermentación. El pretratamiento que se dio al maíz fue: nixtamalización por 20 min; harina con tamaño de partícula menor a la malla 40, desengrasado y cocimiento durante 25 min. El medio de cultivo semisólido preparado tuvo una humedad de 78%, y fue adicionado con extracto de levadura, 0.2%, y  $\text{CaCO}_3$ , 0.03%. Los cultivos se inocularon con *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* con  $2 \times 10^6$  U.F.C./g de masa, y una relación entre las cepas de 3:1. La incubación se realizó a 32°C por 5 días (120 h). En el primer cultivo, el muestreo se realizó cada 12 h y en el segundo cada 3 - 6 h en las primeras 48 h, espaciando luego el periodo de muestreo. Cada cultivo se llevó a cabo por duplicado. Los parámetros químicos, fisicoquímicos y biológicos determinados en ambas series se unificaron en la presentación de los resultados. La dispersión de los datos (error exoerimental) fue verificada por medio del cálculo del coeficiente de variación (C.V.) de cada muestra, y con esos resultados se calculó el promedio de cada parámetro ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ).

## CONSUMO DE SUBSTRATOS.

Los contenidos iniciales de los carbohidratos totales, de los azúcares reductores y del almidón (diferencia entre ambos) fueron: 96.51, 75.65 y 20.87 g/Kg, respectivamente. Esta composición varía dependiendo de la variedad del maíz, de su estado de madurez y del procedimiento de elaboración de la masa. En este caso, el cultivo inició con un elevado contenido de azúcares reductores. Tomando como base las concentraciones iniciales de substratos, se consumió el 53.68% de los carbohidratos totales, el 63.29% de los azúcares reductores y el 18.84% del almidón. Los valores de  $\bar{C} \cdot \bar{V}$  (%) de los carbohidratos totales y de los azúcares reductores fueron: 3.43 y 5.32, respectivamente. Las cinéticas de consumo de los carbohidratos totales y de los azúcares reductores siguieron cinéticas diferentes (Fig. 21). Durante las primeras 24 h se observó la máxima velocidad de consumo de los carbohidratos totales,  $q_{CT} = \Delta C.T. / \Delta t$ , alcanzando un valor de  $q_{CT} = -1.28 \text{ g}_{CT}/(\text{l} \cdot \text{h})$ . Una segunda etapa de consumo lento [ $q_{CT} = -0.31 \text{ g}_{CT}/(\text{l} \cdot \text{h})$ ] inició a las 36 h y concluyó aproximadamente a las 96 h. La concentración de azúcares reductores descendió durante las primeras 48 h de cultivo con una velocidad ( $q_{AR} = \Delta A.R. / \Delta t$ ) de  $-0.91 \text{ g}_{AR}/(\text{l} \cdot \text{h})$ , hasta una concentración residual de  $30.63 \pm 1.94 \text{ g/Kg}$ .

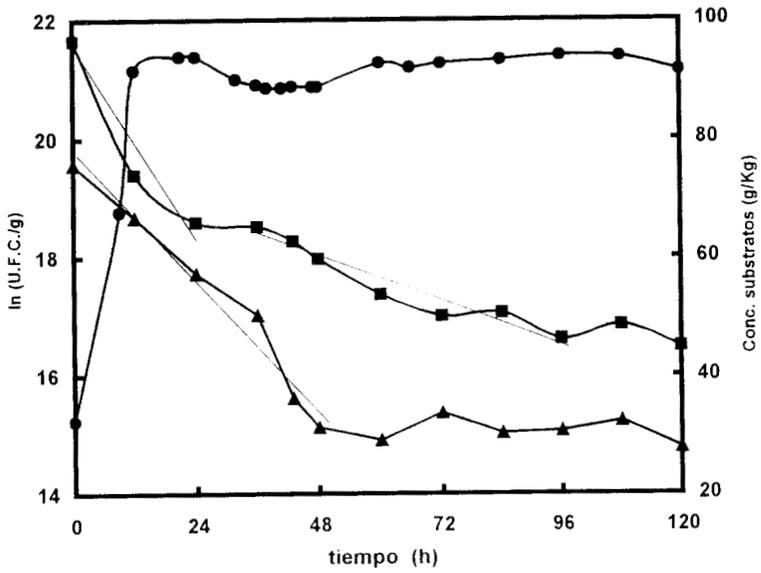


Fig. 21 Cinética de crecimiento de bacterias lácticas y de consumo de substratos en medio de maíz

—●— Crecimiento      —■— Carb. Tot.      —▲— Azúc. Red.

En este sistema no es probable que contribuyera la actividad diastásica del maíz, como ocurre en el ogi (Adeyemi y Beckley, 1986), porque las condiciones de nixtamalización, secado y cocimiento fueron lo suficientemente drásticas como para inactivar a las amilasas vegetales. La utilización del almidón durante las primeras 6 h de cultivo puede atribuirse a la actividad de una microflora mixta que incluye a las bacterias lácticas, pues estas últimas suelen producir más amilasas cuando están en crecimiento activo (Giraud *et al.*, 1994, Li y Chan, 1983, Sen y Chakrabarty, 1984). Ya en la fase estacionaria, la actividad enzimática residual pudo prolongar la degradación lenta del almidón durante varios días, del mismo modo que ocurrió con *Lb. plantarum* (Giraud *et al.*, 1994).

#### CRECIMIENTO MICROBIANO.

Debido a que no se trabajó en condiciones estériles, al realizar los cultivos en placas de agar de microinóculo – almidón para determinar las cuentas de bacterias lácticas, se identificaron tres tipos distintos de colonias. Estos correspondieron a grupos microbianos diferenciados por la morfología microscópica con tinción de Gram, y por la respuesta a la prueba de la catalasa:

*PRIMER GRUPO MICROBIANO.* Colonias puntiformes, con halo de acidez amarillo por presencia del indicador azul de bromo timol. La observación microscópica indicó la presencia de unas colonias de bacilos cortos formando cadenas cortas y otras colonias de cocos grandes en tétradas. Ambas bacterias fueron Gram (+) y catalasa (-). Estas morfologías correspondían a las observadas previamente en los inóculos axénicos: *Lb. acidophilus* y *Pd. pentosaceus*, respectivamente

*SEGUNDO GRUPO MICROBIANO.* Colonias grandes, planas, de borde irregular y aspecto seco; de crecimiento rápido y con formación de halo azul (medio alcalino); la morfología microscópica indicaba que eran bacilos Gram (+) largos, en cadenas; con reacción catalasa (+). Presumiblemente eran *Bacillus* spp.

*TERCER GRUPO MICROBIANO.* Colonias medianas, convexas, de borde regular, color blanco, húmedas, brillantes; de crecimiento rápido y formación de halo de alcalinidad; con morfología al microscopio de bacilos cortos, aislados, Gram (-) y con reacción catalasa (+). Se presume que eran Enterobacterias.

*CINÉTICA DEL CULTIVO.* Los tres grupos bacterianos se desarrollaron durante las primeras 6 h de cultivo, predominando los dos últimos. Estas bacterias contaminantes siguieron presentándose en menor proporción hasta las 48 h de fermentación y a partir del tercer día no se detectaron más *Bacillus* spp. Las Enterobacterias, por otro lado, se presentaron esporádicamente durante las 120 h

de cultivo. Los mismos grupos microbianos se observaron durante la fermentación de una pasta de haba, presentando además, períodos de actividad semejantes (Mehari y Ashenafi, 1995). La inhibición de *Bacillus* spp. después de las 48 h puede atribuirse al descenso del pH, pues no se detectaron cuando éste fue inferior a 4.7. Como las Enterobacterias soportan bien la acidez, estas bacterias pudieron sobrevivir sin predominar en el cultivo; su inhibición parcial puede atribuirse a la posible actividad antimicrobiana de *Pd. pentosaceus* (Strasser y Manca, 1993) y de *Lb. acidophilus* (Nahaisi, 1986).

Las cuentas viables de las bacterias lácticas se determinaron en placas libres de contaminantes, para no exponerse a errores por inhibición. La curva de crecimiento mixto de este grupo de bacterias se presenta en la Fig. 21. La cuenta inicial fue de  $4.09 \times 10^6$  U.F.C./g; no se observó fase latente; la fase de crecimiento exponencial fue de 12 h, después el desarrollo fue más lento, hasta un máximo de  $1.93 \times 10^9$  U.F.C./g a las 21 h. A partir de las 21 h se observó una fase estacionaria durante el resto del cultivo.

En diversos cultivos sumergidos de almidón, las fases de crecimiento guardaron cierta semejanza. La fase exponencial de *Lb. acidophilus* (Li y Chan, 1983) y de otros lactobacilos amilolíticos (Giraud *et al.*, 1994; Sen y Chakrabarty, 1984) también duraron 12 h, pero únicamente *Lb. plantarum* presentó una fase estacionaria de 6 días (Giraud *et al.*, 1994). En el mawè, un alimento fermentado de maíz, *Pd. pentosaceus* creció durante las primeras 12 h únicamente, en tanto que diversos lactobacilos, algunos amilolíticos, se desarrollaron hasta las 72 h

(Hounhouigan *et al.*, 1993). Cuando se inocularon silos de maíz (grano entero) con *Pd. pentosaceus*, sólo o mezclado con lactobacilos, las fases exponenciales fueron muy cortas (6 h); la fase estacionaria de primer cultivo terminó a las 24 h, mientras que el cultivo mixto se prolongó hasta las 72 h, debido a que la sobrevivencia de los lactobacilos fue más larga.

Las cuentas máximas de bacterias lácticas en otros cultivos amiláceos también fueron similares a los del presente trabajo. En los dos cultivos de mawè, éstas fueron de  $1.9$  y  $3.2 \times 10^9$  UFC/g (Cocconcelli *et al.*, 1991), en el gari fue de  $1 \times 10^9$  U.F.C./g (Ofuya y Nnajifor, 1989), y en el siljo de  $6.6 \times 10^{10}$  UFC/g (Mehari y Ashenafi, 1995).

La preparación de los medios de cultivo se realizó en una campana de flujo laminar usando agua y utensilios estériles. Sin embargo, el maíz y la cal pudieron contribuir con una flora microbiana heterogénea en la masa que no fue eliminada completamente en las operaciones de pretratamiento. Considerando que la masa de maíz es un pésimo conductor de calor, la esterilización de los medios por calor hubiera significado un gasto excesivo para un proceso de posible aplicación industrial, por lo que esta operación no era recomendable. Además, el cocimiento excesivo hubiera cambiado el sabor y la consistencia de la masa.

Los microorganismos que se presentan en las fermentaciones a base de maíz pueden ser diferentes en cada lote; por ejemplo, Akinrele (1970) aisló *Corynebacterium* sp., *Aerobacter cloacae*, *Lb. plantarum*, *Candida mycoderma*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula*; mientras que Adegoke y Babalola (1988) detectaron la presencia de *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis* y *S. cerevisiae* en las primeras 48 h de fermentación.

#### CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA.

La cinética de producción de ácido láctico en el medio semisólido de maíz se muestra en la Fig. 22. Se observa una primera fase de producción de las 9 a las 24 h, con la mayor velocidad de producción del cultivo ( $q_{\text{ACL}} = \Delta \text{A.L.} / \Delta t$ ), con un valor de  $0.10 \text{ g}_{\text{ACL}} / (\text{l} \cdot \text{h})$ ; esta fase correspondió a un incremento del potencial eléctrico (Eh), a un decremento del pH de aproximadamente una unidad (Fig. 22), y a la fase exponencial de crecimiento microbiano (Fig. 21). De las 24 a las 84 h de cultivo se presentó otra fase de producción de ácido láctico más lenta, con un valor de  $q_{\text{ACL}} = 0.05 \text{ g}_{\text{ACL}} / (\text{l} \cdot \text{h})$ . En esta fase se observó además un incremento gradual del potencial Eh, una lenta disminución del pH hasta llegar a 4.5, y una prolongada fase estacionaria de la curva de crecimiento microbiano.

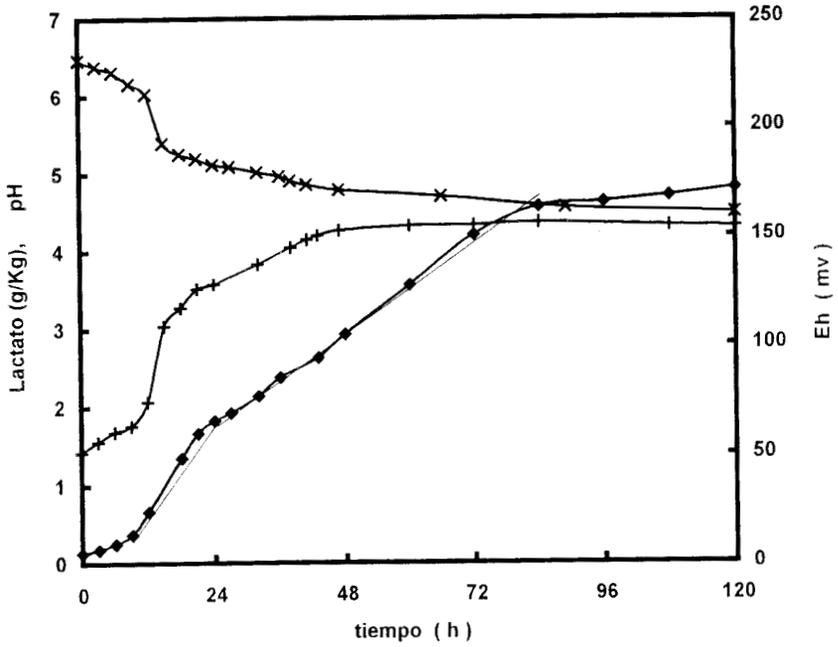


Fig. 22 Cinética de producción de lactato, pH y potencial eléctrico en la fermentación láctica de maíz

—●— Lactato —×— pH —+— Eh

La disminución del pH en los medios amiláceos influye en las actividades enzimáticas y fermentativas, aumenta la capacidad de hidratación de las proteínas haciéndolas más asimilables, ablanda la masa (Barber *et al.*, 1987), y contribuye a inhibir a los microorganismos contaminantes.

Los valores iniciales de concentración de ácido láctico, de pH y de potencial Eh fueron: 0.13 g/Kg, 6.47 y 50.5 mv, respectivamente; y los correspondientes valores finales fueron: 4.8 g/Kg, 4.48 y 154 mv. La dispersión de los datos fue baja, considerando los valores de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ , que en el mismo orden fueron: 4.58%, 0.31% y 1.26%. Se produjo más ácido láctico en este cultivo (4.67 g/Kg) que en el de la 2ª serie de maíz (2.37 g/Kg), debido probablemente a la concentración inicial de azúcares reductores.

La acidez obtenida en un alimento fermentado debe estar también dentro de los parámetros de aceptabilidad gustativa, que dependen de cada producto. Por ejemplo, mientras que el yoghurt sabe mejor si el ácido láctico se encuentra entre 8.5 y 12 g/Kg (Tamime y Deeth, 1980), los niveles de aceptabilidad más altos para algunos alimentos amiláceos como las salsas de semillas (Coleman y Ooraikul, 1989) o el puré de plátano (Porres *et al.*, 1985), fueron más altos cuando el ácido láctico estaba entre 3.3 y 5 g/Kg.

El potencial Eh inicial de este cultivo fue más bajo que los observados en la 2ª serie de maíz (218 - 232 mv). En ambos casos se observaron composiciones y valores de pH iniciales similares, por lo que la diferencia en el Eh puede atribuirse al

efecto del aire incorporado a las masas durante el mezclado. En la 2ª serie de maíz hubo una mayor disolución de O<sub>2</sub> porque cada frasco se mezcló por separado en la campana de flujo laminar, debido a que tenían concentraciones diferentes de inóculo y de extracto de levadura. En el cultivo presente se mezcló todo el medio inoculado en un solo recipiente antes de llenar los frascos, por lo que la incorporación de aire fue menor.

El coeficiente de correlación inversa calculado entre los perfiles de pH y Eh de la Fig. 22 fue muy elevado,  $r^2 = -0.9939$ . Este valor indica que la caída de pH fue el factor principal en el cambio de potencial Eh; esta tendencia es normal en las fermentaciones en donde el resto de los factores no influye notablemente (Ishizaki *et al.*, 1974). Fields *et al.* (1981) atribuyeron a cepas de *Pd. pentosaceus* y a algunas especies de lactobacilos amilolíticos la capacidad de elevar el Eh de un cultivo mixto a base de maíz, alcanzando valores estables de 300 y 450 mv.

#### CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (A.G.V.).

En la Fig. 23 se presentan las curvas de cinética de producción de los A.G.V. (ácidos acético, propiónico y butírico) que se obtuvieron en la fermentación en medios a base de maíz. El orden de abundancia entre ellos fue: ácido acético > ácido propiónico > ácido butírico. Los valores de  $\bar{C}_V$  (%) calculados para estos ácidos fueron: 4.36, 2.94 y 4.10, respectivamente.

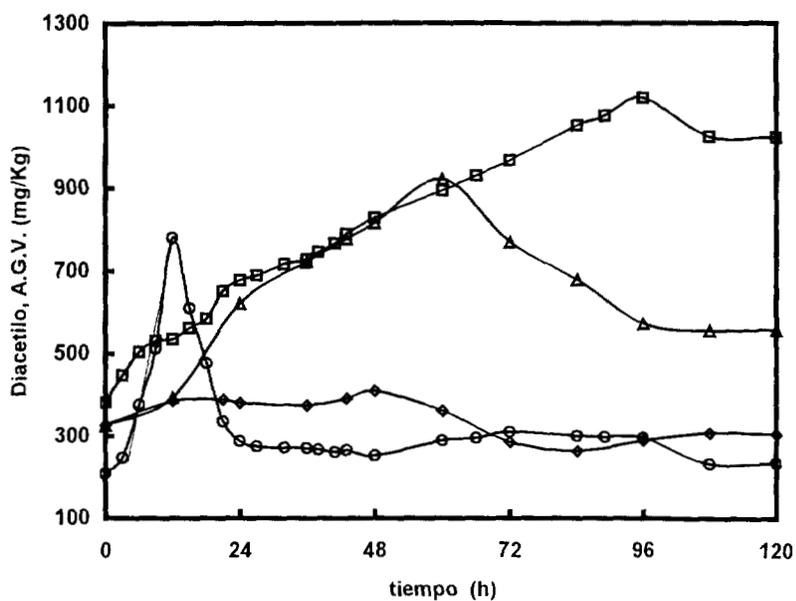


Fig. 23 Cinética de producción de diacetilo y ácidos grasos volátiles en la fermentación láctica de maíz

○ Dia (mg/Kg)                      □ Ac. acético  
 ▲ Ac. propiónico                  ◆ Ac. butírico

La concentración inicial de los A.G.V. proviene de los lípidos del maíz, dando una concentración de los tres ácidos analizados muy semejante. La producción de los A.G.V. durante el cultivo puede atribuirse al metabolismo de los tres grupos microbianos mencionados previamente (McFaddin, 1980; Parés y Juárez, 1997), considerando que *Bacillus* spp. estuvieron muy activos en las primeras horas del cultivo, mientras que las bacterias lácticas y las Enterobacterias sobrevivieron durante todo el cultivo.

*PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO.* La concentración inicial del ácido acético fue de 368 mg/Kg, incrementándose en varias etapas durante el cultivo. La mayor velocidad de producción se presentó durante las primeras 9 h, coincidiendo con un período poco activo de producción de ácido láctico (Fig. 22), con uno de consumo acelerado de carbohidratos totales y con la fase exponencial de las bacterias lácticas (Fig. 21). Sin embargo, no guardó relación evidente con el perfil de azúcares reductores. La siguiente fase inició inmediatamente después, tuvo menor velocidad y terminó a las 96 h de cultivo, llegando a acumular 1 118 mg/Kg. La máxima concentración de ácido acético fue superior a las observadas en la 1ª y 2ª series de maíz, en donde se produjeron 566 y 459 mg/Kg, respectivamente.

Las dos bacterias lácticas inoculadas en la presente fermentación son homolácticas, pues el metabolismo inicial del substrato se realiza por la vía de la glucólisis. Sin embargo, el metabolismo del piruvato de *Pd. pentosaceus* es

especialmente activo y pudo formar ácido acético, como se observó en el último cultivo axénico en almidón, donde formó 204 mg/l. Otras cepas de *Pd. pentosaceus* han sido también capaces de producir ácido acético a partir del consumo de hexosas y pentosas (Tetlow y Hoover, 1988). En contraste, *Lb. acidophilus* fue menos activo en el cultivo axénico en almidón, pues produjo solamente 78 mg/Kg.

Una concentración de ácido acético de 188 mg/l en el dhokla (producto fermentado y cocido, a base de cereal y cuajada láctea) fue considerada sensorialmente aceptable (Joshi *et al.*, 1989). El exceso de este ácido es indeseable porque puede impartir un aroma a vinagre en los productos fermentados.

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PROPIÓNICO.** El contenido inicial de ácido propiónico fue de 325 mg/Kg y no hubo formación durante las primeras 12 h. A partir de ese momento inició la fase de producción, la cual alcanzó la máxima concentración, 920 mg/Kg, a las 60 h, para disminuir después lentamente. La concentración máxima del cultivo superó a las observadas en la 1ª y en la 2ª series de maíz, cuyos valores fueron de 213 y 708 mg/Kg, respectivamente. Las concentraciones máximas en los cultivos de maíz pueden considerarse muy elevadas si se comparan con las que tuvieron buena aceptabilidad en el dhokla, 72 mg/l (Joshi *et al.*, 1989) o en el yoghurt, 179 mg/Kg (Laye *et al.*, 1993).

Aunque previamente *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* habían mostrado su capacidad de formar pequeñas cantidades de ácido propiónico en los cultivos axénicos en almidón (58 y 35 mg/Kg, respectivamente), su producción en el cultivo

mixto en maíz no parece estar ligada al crecimiento de las bacterias lácticas (Fig. 21), pues su formación ocurrió durante la fase estacionaria.

*PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO.* El ácido butírico inició con 327 mg/Kg (Fig. 23). Este valor se mantuvo más o menos constante hasta las 48 h y después empezó a disminuir lentamente hasta llegar a una concentración final de 305 mg/Kg, por lo que la pérdida neta fue de 22.5 mg/Kg al término de la fermentación. Estos resultados demuestran que la selección de condiciones de pretratamiento de maíz fue la apropiada para que no se incrementara la concentración de este ácido. Sin embargo, la concentración de este ácido fue más elevada que el observado en el dhokla, 74 mg/l (Joshi *et al.*, 1989), o en el queso cheddar, 50 mg/Kg (Dacremont y Vickers, 1994), los cuales contribuyeron con los aromas agradables detectados. Es importante tener un control de este ácido porque en exceso imparte un fuerte aroma nauseabundo e indeseable.

Es importante mencionar que el contenido total de A.G.V. en la masa fue menor a las 12 h de cultivo, 1 312 mg/Kg que al término del mismo, 1 886 mg/Kg. Estos valores fueron notablemente superiores al reportado en el Dhokla, 696 mg/Kg (Joshi *et al.*, 1989), por lo que podrían alcanzar un nivel sensorial objetable. La alta producción de ácido acético (1 118 mg/Kg) y de ácido propiónico (920 mg/Kg) pudo deberse a la elevada concentración inicial de azúcares reductores.

## CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL DIACETILO.

La curva de producción de diacetilo se muestra en la Fig. 23. El  $\bar{C}_V$  de este parámetro fue de 1.17%. La concentración inicial fue de 226.73 mg/Kg; pero a partir de las 3 h de cultivo la producción se aceleró bruscamente hasta las 12 h, acumulando 779.56 mg/Kg. El incremento neto en ese período fue de 552.83 mg/Kg, valor que superó al máximo obtenido en la 2ª serie de maíz (311.60 mg/Kg). Después de la 12 h de fermentación, la concentración de diacetilo disminuyó muy rápidamente. Esta actividad originó que apenas a las 24 h del cultivo, su concentración hubiera disminuido a 287 mg/Kg, para mantenerse más o menos constante en el resto del cultivo. Es decir, la producción de diacetilo se presentó durante la fase de crecimiento exponencial. Es conveniente parar la fermentación en ese momento y proponer un método para conservar el diacetilo.

*PARÁMETROS CINÉTICOS.* Se aplicaron las ecuaciones para la formación de los metabolitos primarios (Pirt, 1975) en la producción de diacetilo a pesar de que se trató de un cultivo mixto, debido a que su producción estuvo asociada directamente a la cinética de crecimiento de las bacterias lácticas (Fig. 21). Con estas ecuaciones se calcularon algunos parámetros cinéticos, cuyos resultados se presentan en el Cuadro 51.

**Cuadro 51**  
**Parámetros cinéticos de crecimiento de bacterias lácticas**  
**y de producción de diacetilo en el cultivo de maíz con**  
***Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* (período: 0 - 12 h)**

| Parámetro                        | Valores               |   |
|----------------------------------|-----------------------|---|
| $\mu = (\ln X/X_0) / \Delta t$   | 0.4705 <sup>a)</sup>  | 1 / h                                   |
| $\Delta X = X - X_0$             | 5.9245                | ln (U.F.C. / g <sub>masa</sub> )        |
| $\Delta p = p - p_0$             | 571.7497              | $\mu g_{Diac} / g_{masa}$               |
| $Y_{P/X} = \Delta p / \Delta X$  | 96.5063 <sup>b)</sup> | $\mu g_{Diac} / \ln (U.F.C.)$           |
| $q_P = Y_{P/X} \cdot \mu$        | 45.4022               | $\mu g_{Diac} / [\ln (U.F.C.) \cdot h]$ |
| $P_{Diac} = \Delta p / \Delta t$ | 47.6458               | $\mu g_{Diac} / (g_{masa} \cdot h)$     |

a) Con coeficiente de regresión,  $r^2 = 0.9715$

b) Con coeficiente de correlación = 0.9972

*Lb. acidophilus* y *Pd. pentosaceus* en el cultivo mixto presentaron una velocidad específica de crecimiento de  $\mu = 0.47$  1/h, que es un valor es semejante a los reportados en la literatura para las bacterias lácticas. *Pd. pentosaceus* cultivado en medios a base de azúcares simples presentó velocidades de crecimiento de  $\mu = 0.17 - 0.19$  1/h, determinadas por Rodríguez y Manca (1994), y de  $\mu = 0.22 - 1.27$  1/h, reportadas por Blickstad y Molin (1981). Un valor de  $\mu = 0.3$  1/h fue calculado a partir de los datos de crecimiento de *Lb. acidophilus* en medio de maltosa, en cultivos realizados por Li y Chan (1983).

La formación de diacetilo (Fig. 23) coincidió además con la etapa de consumo acelerado de los carbohidratos totales (Fig. 21). Aunque disminuyeron también los azúcares reductores en esa etapa, el consumo de éstos últimos no se detuvo sino hasta varias horas después de que había terminado la producción de diacetilo, favoreciendo probablemente la acumulación de altos niveles de A.G.V.

Durante la etapa de producción acelerada de diacetilo se incrementaron ligeramente la concentración de ácido láctico y el potencial Eh; pues a las 12 h de cultivo, estos parámetros valieron 0.665 g/Kg y 73.75 mv, respectivamente.

Potenciales eléctricos semejantes se han observado en ambientes de microaerobiosis en los cultivos microbianos (Ishizaki *et al.*, 1974). Sin embargo, Klaver *et al.* (1992) aconsejan airear los productos de fermentación láctica antes de almacenarlos, para elevar el potencial Eh y prolongar la estabilidad del diacetilo formado.

La formación de diacetilo en este cultivo mixto se atribuyó principalmente a la actividad de la cepa de *Pd. pentosaceus* inoculada, pues la de *Lb. acidophilus* no es capaz de producirlo (Verde *et al.*, 1995). Litopoulou *et al.* (1989) evaluaron la capacidad de formar diacetilo de 59 cepas de *Pediococcus* spp., de las cuales 51 fueron positivas, por lo que se deduce que la actividad es frecuente en esta especie. Aunque diversas especies del género *Bacillus* y de las Enterobacterias tienen la capacidad de producir diacetilo (McFaddin, 1980; Parés y Juárez, 1997), no se considera que en este cultivo hayan contribuido significativamente, pues el incremento fuerte del producto no se prolongó hasta las 48 h como *Bacillus* spp., o hasta el final del cultivo como las Enterobacterias.

Algunos compuestos del medio o formados durante el cultivo pudieron influir en la biosíntesis del diacetilo. En los cultivos axénicos sumergidos que se realizaron previamente con *Pd. pentosaceus* en medios con almidón en este trabajo, la concentración alta de glucosa inicial (1%) favoreció la producción de diacetilo, en lugar de inhibirla. En los cultivos de maíz no se adicionó ningún carbohidrato extra a la masa, por lo que los azúcares reductores provenían inicialmente del maíz, y posteriormente de la hidrólisis del almidón por la amilasas bacterianas. Durante las primeras 12 h de este cultivo de maíz, los carbohidratos consumidos fueron la fuente energética del crecimiento de las bacterias lácticas, produciendo también diacetilo.

Cogan *et al.* (1989) lograron mejorar el rendimiento de diacetilo con *Lactococcus lactis* limitando la biosíntesis del ácido lipóico. El ácido lipóico es el cofactor de la enzima piruvato deshidrogenasa, la cual compite por el piruvato con la

enzima  $\alpha$ -acetolactato sintetasa; la primera enzima orienta a la formación de acetato, mientras que la segunda inicia una de las rutas de biosíntesis de la acetoina + diacetilo. Shimazu *et al.* (1985) por otro lado, determinaron que el ion  $\text{Co}^{2+}$  incrementa la formación de diacetilo al favorecer la actividad de la enzima  $\alpha$ -acetolactato sintetasa. En el presente cultivo el medio era complejo, tanto por el maíz como por el extracto de levadura añadido; este último es una fuente reconocida de ácido lipóico, de  $\text{Co}^{2+}$  y de otros micronutrientes; sin embargo, ya desde la 2ª serie de maíz se determinó que la adición de extracto de levadura favorecía la formación del diacetilo.

Después de las 12 h del cultivo en maíz la concentración de diacetilo bajó drásticamente. Esta disminución pudo deberse a que el crecimiento de las bacterias lácticas fue más lento después de las 12 h, mientras que el consumo de azúcares reductores continuó con la misma velocidad hasta las 36 h (Fig. 21). Estas condiciones son propicias para formar un exceso de  $\text{NADH}_2$  y una consecuente pérdida de diacetilo, como se ha observado en otros sistemas. Kaneko *et al.* (1990) determinaron que cuando una bacteria láctica consume glucosa muy rápidamente con una producción de ácido láctico lenta, puede acumular un exceso de  $\text{NADH}_2$ . Este cofactor es acoplado entonces por la enzima diacetil reductasa, la cual transforma el diacetilo en acetoina (compuesto inodoro), liberando  $\text{NAD}^+$ . Keenan *et al.* (1966) estudiaron la formación de diacetilo por *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* en leche, donde se formó la máxima concentración de diacetilo

(2.55 mg/l) entre las 10 - 12 h de cultivo. Después de ese período, también se inició la reducción de este producto en acetoina.

### CONCLUSIONES.

- La utilización lenta de los carbohidratos no-reductores por las bacterias lácticas prolongaron la fase estacionaria y la de formación de ácido láctico.
- Las bacterias lácticas inoculadas predominaron en el cultivo, pero la contaminación por *Bacillus* spp. y Enterobacterias pudo contribuir a hidrolizar el almidón, así como a elevar las concentraciones de ácido láctico y de A.G.V. en la masa fermentada.
- El potencial eléctrico (Eh) de este sistema fue influenciado inicialmente por la cantidad de aire incorporado en el mezclado del medio de cultivo; pero ya durante la fermentación, el factor determinante para que el producto adquiriera un valor medio de Eh fue el cambio de pH.
- La producción de ácido butírico fue baja, debido a la aplicación de las condiciones de pretratamiento de maíz seleccionadas previamente.
- La cinética de producción de diacetilo estuvo asociada directamente a la cinética de crecimiento de las bacterias lácticas.
- Al descender la velocidad de crecimiento de las bacterias lácticas, la biosíntesis del diacetilo se interrumpió, mientras que los azúcares reductores siguieron consumiéndose a la misma velocidad.

- En las presentes condiciones de cultivo, el tiempo óptimo para detener la fermentación fue de 12 h, ya que en ese momento se obtuvo la mayor concentración de diacetilo y aún se tenían niveles bajos de A.G.V., con una concentración de ácido láctico baja.
- Las concentraciones máximas de los ácidos láctico y butírico obtenidas, estuvieron dentro de los niveles usuales en las fermentaciones amiláceas; y las concentraciones máximas de los ácidos acético y propiónico, además de la del diacetilo, fueron más altas que las correspondientes en sistemas similares, incluyendo a los cultivos sumergidos en almidón.

## LOCALIZACIÓN DE LAS AMILASAS EN LAS CÉLULAS Y DETERMINACIÓN DE SUS ACTIVIDADES.

Cuando se realizaron los cultivos axénicos en medios a base de almidón se observó que los mayores consumos de almidón *in situ* no ocurrieron en los cultivos que habían presentado las actividades amilolíticas extracelulares más elevadas, detectadas en ensayos *in vitro*. Se plantearon algunas hipótesis para explicar este comportamiento. Como *Pd. pentosaceus* sí fue capaz de consumir almidón *in situ*, pero no se detectó actividad amilolítica en el caldo de cultivo; la enzima puede estar ligada a la pared celular o en el citoplasma. Ya que los cultivos de *Lb. acidophilus* con mayor consumo de almidón no fueron los que presentaron la mayor actividad en el ensayo enzimático *in situ*, probablemente existe una amilasa adicional ligada a la célula; o bien, los componentes del caldo de cultivo pudieron afectar la actividad hidrolítica extracelular.

Para comprobar estas hipótesis se realizaron cultivos axénicos en medios de almidón. Se determinaron las actividades amilolíticas en extractos crudos obtenidos de los cultivos axénicos de *Pd. pentosaceus* o de *Lb. acidophilus*. Los extractos fueron preparados de tres fracciones: el caldo de cultivo clarificado, los sedimentos de células rotas (pared y membrana citoplásmica) y la fracción intracelular. Se realizó un cultivo para cada cepa utilizando las mismas condiciones ambientales y de composición seleccionadas en las series 1ª y 2ª en medio de almidón. La concentración de  $\text{CaCO}_3$  fue establecida a 0.03% y la temperatura de incubación a 28°C. Sin embargo, en esta serie se utilizaron concentraciones bajas de glucosa y de

almidón (0.5%), con el objetivo de tener la mínima concentración de carbohidratos residuales al final de la fermentación para facilitar los análisis enzimáticos. Los análisis químicos se realizaron al inicio y final de la fermentación, se determinó el pH, la concentración de ácido láctico, de carbohidratos totales y de azúcares reductores. Adicionalmente, se cuantificaron los contenidos de los A.G.V. y del diacetilo por C.G. Los análisis biológicos aplicados fueron los siguientes: determinación de la cuenta viable de bacterias lácticas y de las actividades amilolíticas de extractos crudos de las células rotas (en sedimentos y sobrenadante) y del caldo centrifugado. El valor obtenido se relacionó a la cuenta de células viables y luego al volumen de caldo fermentado, a fin de presentar los resultados de actividad en unidades internacionales (U: cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa/min, en las condiciones de ensayo). Como en los cultivos previos, aquí también se calculó el coeficiente de variación (C.V.) a muestras iniciales y finales de cada parámetro, para determinar el error experimental. Después se calcularon los promedios ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ).

#### CULTIVO CON *Pd. pentosaceus*.

El resumen de los análisis químicos y fisicoquímicos realizados al cultivo se presenta en el Cuadro No. 52, en éste se observan cambios moderados de pH, producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos (totales, reductores y almidón), pues la temperatura de incubación no era la más favorable para el metabolismo de producción de ácido láctico, según se determinó en las series previas.

**Cuadro No 52**  
**Resumen de los datos analíticos del cultivo en almidón con**  
***Pd. pentosaceus* para determinar actividad amilolítica**

| <b>Parámetros<br/>analizados</b>    | <b>Inicial<br/>(<math>\bar{x}</math>)</b> | <b>Final<br/>(<math>\bar{x}</math>)</b> | <b>C. V.<sup>c)</sup><br/>(%)</b> | <b>Cambio<br/>(final - Inic.)</b> |
|-------------------------------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| pH                                  | 6.5                                       | 4.66                                    | 0.15                              | 1.84                              |
| Ac. láctico (g/l)                   | 0.59                                      | 1.49                                    | 10.37                             | 0.90                              |
| Carb. Tot. (g/l)                    | 15.48                                     | 11.40                                   | 1.17                              | -4.08                             |
| Azúc. Red. (g/l)                    | 5.39                                      | 3.69                                    | 5.70                              | -1.70                             |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)         | 10.09                                     | 7.71                                    | --                                | -2.38                             |
| Ác. acético <sup>b)</sup> (mg/l)    | 76.85                                     | 203.79                                  | 15.11                             | 126.94                            |
| Ác. propiónico <sup>b)</sup> (mg/l) | 28.08                                     | 58.38                                   | 6.28                              | 30.30                             |
| Ác. butírico <sup>b)</sup> (mg/l)   | 26.21                                     | 30.75                                   | 11.09                             | 4.54                              |
| Diacetilo <sup>b)</sup> (mg/l)      | 18.86                                     | 58.70                                   | 4.71                              | 39.84                             |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red.

b) Determinado por C.G.L.

c) Coeficiente de variación de los experimentos: C. V. = (Desv. Est./Prom.) • 100

El análisis de C.G. indicó que la producción conjunta de los A.G.V. (293 mg/Kg) se consideró baja si se compara con la de los ácidos grasos libres producidos en ensilados vegetales (3200 - 16,000 mg/Kg), donde la fermentación es heterogénea y se realiza a mayor temperatura (Margalith, 1981; Watson *et al.*, 1984). Un bajo contenido de A.G.V. es deseable en la nota aromática tipo mantequilla donde el aroma impartido por el diacetilo debe ser el dominante. Como en los experimentos anteriores, la producción de ácido acético fue relativamente mayor que las de los ácidos propiónico y butírico. El diacetilo acumulado fue de 58.7 mg/Kg, que es un nivel menor que los producidos en las series 2 y 3 en almidón. Los valores promedio de los coeficientes de variación (  $\bar{C}$ .  $\bar{V}$ . ) de los parámetros químicos analizados indican que en general, la variabilidad de los datos fue aceptable, aunque en el caso del ácido acético, ésta fue un poco mayor.

Los resultados de los análisis biológicos (microbiológicos y enzimáticos) se muestran en el Cuadro 53. Es interesante observar que a pesar de que el medio de cultivo no tenía la riqueza y el equilibrio nutrimental de la leche, la cuenta de bacterias lácticas alcanzada después de la fermentación de almidón fue elevada ( $9.7 \times 10^7$  U.F.C./ml); sobrepasando la cuenta de bacterias lácticas mínima que establece la norma oficial NOM-002-SCFI-1993 (SECOFI, 1993) para el yoghurt, que es de  $2 \times 10^6$  U.F.C./ml.

**Cuadro No. 53**  
**Resumen de los análisis biológicos del cultivo en almidón con**  
***Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* para determinar actividad amilolítica**

| Parámetros  | <i>Pd. pentosaceus</i> |                        | <i>Lb. acidophilus</i> |                        |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|   | Valor ( $\bar{x}$ )    | C.V. <sup>b)</sup> (%) | Valor ( $\bar{x}$ )    | C.V. <sup>b)</sup> (%) |
| Cuenta viable (U.F.C./ml) x 10 <sup>7</sup>                   | 9.7                    | 0.96                   | 2.4                    | 3.09                   |
| Act. amilolítica extracelular (U / l) <sup>a)</sup>           | 0                      | --                     | 4,187.3                | 2.63                   |
| Act. amilolítica ligada a pared celular (U / l) <sup>a)</sup> | 47.32                  | 0                      | 6.16                   | 9.07                   |

a) U / l: Cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa/min, por cada litro de caldo fermentado (Fracc. correspondiente); pH= 5.5; *Pd. pentosaceus* a 30°C y *Lb. acidophilus* a 37°C.

b) Coeficiente de variación de los experimentos: C.V.= (Desv. Est./Prom.)  $\bullet$  100

La actividad amilolítica extracelular fue determinada en este caso a dos temperaturas: a 30 y a 37°, que son representativas del rango de 25 - 55°C, que ha sido utilizado por otros autores para las amilasas de bacterias lácticas (Champ *et al.*, 1983; Giraud *et al.*, 1993; Li y Chan, 1983; Olympia *et al.*, 1995; Sen y Chakrabarty, 1984). No se observó actividad de amilasas extracelulares por esta cepa en las condiciones de ensayo, lo que es congruente con las características indicadas para esta cepa en el Manual de Bergey's (Garvie, 1986). Sin embargo, el seguimiento cuantitativo del almidón mostró claramente que el microorganismo tenía la capacidad de utilizarlo. Por lo que se realizaron ensayos para buscar la posible actividad ligada a la célula usando extractos enzimáticos no purificados de la fracción de sedimentos de las células rotas (pared celular y membrana citoplásmica) y de la fracción citoplásmica (intracelular). Los ensayos demostraron que la única actividad (47 U/l) de *Pd. pentosaceus* se detectó ligada a la pared celular, realizada a 30°C y pH = 5.5 (Cuadro No. 53) y los valores de los coeficientes de variación promedio ( $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$ ) de los análisis biológicos mostrados en el mismo cuadro indicaron que existió una dispersión de resultados aceptable.

La mayor parte de las amilasas estudiadas en las bacterias lácticas son extracelulares, las actividades observadas varían ampliamente dependiendo de la cepa, de las condiciones de cultivo y del ensayo. Las actividades de diversas amilasas extracelulares, intracelulares y ligadas a la pared celular de algunas especies de lactobacilos se han encontrado en el rango de 0.17 - 240,000 U/l (Champ *et al.*, 1983; Giraud *et al.*, 1993; Iman *et al.*, 1991; Li y Chan (1983); Olympia *et al.*, 1995, Sen y

Chachrabarty, 1984). Dentro de los pediococos, *Pd. damnosus* es un activo productor de acidez en medios a base de almidón (Garvie, 1986), mientras que para *Pd. pentosaceus*, aislado de substratos amiláceos (Merseburger *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1995; Oyeyiola, 1991) no hay reportes de caracterización de amilasas; sin embargo, hay evidencias de que algunas enzimas de *Pd. pentosaceus* que utilizan oligosacáridos están generalmente codificadas en plásmidos (González y Kunka, 1986), como en los casos de las  $\alpha$ -amilasas de *Lb. plantarum* (Olympia *et al.*, 1995) y de *Lb. amyloborus* (Iman *et al.*, 1991).

#### CULTIVOS CON *Lb. acidophilus*.

Los resultados de los análisis químicos (Cuadro 54) muestran que no hubo mucha producción de ácido láctico (1.83 g/l), lo que se reflejó en una ligera disminución del pH y poco consumo de carbohidratos (totales, reductores y almidón). Este comportamiento se debió a que el cultivo se llevó a cabo a 28°C, mientras que la óptima para *Lb. acidophilus* es de 35 - 38°C, produciendo en este caso hasta 3.05 g/l de ácido láctico (Kandler y Weiss, 1986; Nahaisi, 1986; Verde *et al.*, 1995).

El análisis de C.G. (Cuadro 54) indicó que este lactobacilo formó muy pequeñas cantidades de A.G.V., predominando el ácido propiónico sobre los ácidos acético y butírico.

**Cuadro 54**  
**Resumen de los datos analíticos del cultivo en almidón con**  
***Lb. acidophilus* para determinar actividad amilolítica**

| Parámetros<br>analizados            | Inicial<br>( $\bar{x}$ ) | Final<br>( $\bar{x}$ ) | C. V. <sup>c)</sup><br>(%) | Cambio<br>(final - Inic.) |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| pH                                  | 6.48                     | 4.47                   | 0.24                       | 2.01                      |
| Ac. láctico (g/l)                   | 1.22                     | 3.05                   | 2.93                       | 1.83                      |
| Carb. Tot. (g/l)                    | 14.52                    | 11.77                  | 1.03                       | -2.75                     |
| Azúc. Red. (g/l)                    | 5.00                     | 3.57                   | 8.36                       | -1.43                     |
| Almidón <sup>a)</sup> (g/l)         | 9.52                     | 8.20                   | —                          | -1.32                     |
| Ác. acético <sup>b)</sup> (mg/l)    | 67.72                    | 77.71                  | 8.14                       | 9.99                      |
| Ác. propiónico <sup>b)</sup> (mg/l) | 23.19                    | 35.09                  | 5.00                       | 11.90                     |
| Ác. butírico <sup>b)</sup> (mg/l)   | 26.18                    | 30.61                  | 7.60                       | 4.43                      |

a) Valor calculado: Carb. Tot. - Azúc. Red.

b) Determinado por C.G.L.

c) Coeficiente de variación de los experimentos: C.V.= (Desv. Est./Prom.) • 100

*Lb. acidophilus* es una bacteria conocida por desarrollar lo que se conoce como "acidez plana" durante la fermentación láctica, porque produce casi exclusivamente ácido láctico y su contribución al aroma no es importante (Nahaisi, 1986).

Los valores de  $\bar{C}$ ,  $\bar{V}$  de los análisis químicos realizados en este cultivo indicaron una dispersión de datos muy baja.

El Cuadro 53 muestra los datos de los análisis biológicos aplicados a esta cepa. La cuenta viable final fue elevada, sobrepasando la mínima deseable en el yoghurt (SECOFI, 1993) y las de los cultivos mixtos de la 3ª serie en almidón. La cepa de *Lb. acidophilus* mostró una buena actividad amilolítica extracelular en el ensayo realizado a 37°C (4,187.3 U/l), mientras que a 30°C no se detectó actividad. Se encontró poca actividad (6.16 U/l) a 37°C en la fracción de los fragmentos sedimentados de las células rotas (pared celular y membrana citoplásmica), aunque no observó actividad en la fracción intracelular a 37°C.

Se detectado actividades amilolíticas de *Lb. acidophilus* cuando los ensayos se realizan entre 37 - 55°C, con pH entre 5-6.5 (Champ *et al.*, 1983; Li y Chan, 1983). Champ *et al.* (1983) detectaron una amilasa extracelular de actividad muy baja en una cepa de esta especie. Las actividades de las amilasas intracelulares de algunas cepas estudiadas fueron variables: 1.69 U/l y 0.169 U/l, pero no se detectaron amilasas ligadas a la pared celular. Por otro lado, Li y Chan (1983) demostraron que la edad del cultivo era determinante en las actividades de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa de *Lb. acidophilus*, pues durante un crecimiento microbiano de 26 h, la fracción intracelular alcanzó una actividad de 240 000 U/l, mientras que en la pared celular era de 73 333

U/l. Después, las actividades cayeron drásticamente al iniciar la fase estacionaria. Estos autores no detectaron actividad extracelular

En el presente trabajo la actividad amilolítica extracelular fue notoriamente más alta que la ligada a la pared celular (Cuadro 53). Estos resultados pudieron estar influenciados tanto por la cepa, como por la edad del cultivo, que fue muy largo (5 días). Al existir dos amilasas que contribuyeron a la hidrólisis del almidón durante el cultivo, las condiciones que las favorecían o inhibían pudieron ser diferentes para cada una, por lo que las enzimas deben caracterizarse por separado en trabajos futuros. Además, el consumo global de almidón *in situ* está influenciado por ambas actividades, lo que origina las diferencias con respecto a lo observado en los ensayos de actividad extracelular.

## CONCLUSIONES.

Ambos cultivos presentaron baja actividad de consumo de sustratos y de producción de ácido láctico. Esta baja acidez favoreció el crecimiento microbiano. Entre las dos cepas, *Pd. pentosaceus* fue la que formó más biomasa; debido posiblemente a que la temperatura de cultivo era más apropiada para esta bacteria que para *Lb. acidophilus*. Ambas cepas produjeron A.G.V. pero con un perfil diferente, pues mientras *Pd. pentosaceus* acumulaba más A.G.V. con predominio del ácido acético, *Lb. acidophilus* producía niveles bajos de los tres A.G.V. cuantificados, predominando el ácido propiónico.

Se determinaron dos amilasas producidas por *Lb. acidophilus*, una que excretó al caldo y otra menos activa ligada a la pared celular, entre ambas, la mayor actividad fue la de la amilasa extracelular.

Por otro lado, esta es la primera vez que se demuestra que *Pd. pentosaceus* es capaz de producir una amilasa; ésta se ubicó en la fracción con fragmentos de la pared celular, aunque con una actividad muy baja.

Estos resultados justifican el consumo de almidón que se observó durante la fermentación láctica de las series de cultivos axénicos anteriores. El consumo de carbohidratos y las producciones de lactato y de diacetilo fueron menores a las observadas en la 2ª serie de almidón; este comportamiento pudo deberse a que las concentraciones iniciales de glucosa y almidón en estos cultivos fueron más bajas que en dicha serie. Por otro lado, se observó que la actividad amilolítica extracelular de *Lb. acidophilus* fue superior a la observada en la 2ª serie en almidón, debido posiblemente a que la baja acidez no fue inhibitoria en esta serie.

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**



## VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### CONCLUSIONES

#### CULTIVOS AXÉNICOS EN ALMIDÓN.

- El consumo de almidón por *Pd. pentosaceus* a los 5 días se vio favorecido por la temperatura de incubación de 28°C, por la ausencia de glucosa en el medio y por la interacción de CaCO<sub>3</sub> (0.02%) con la ausencia de glucosa.
- En los mismos sistemas de fermentación, *Lb. acidophilus* presentó un consumo de almidón altamente significativo en cultivos realizados a 28°C, añadidos de glucosa (1%) y CaCO<sub>3</sub> (0.03). Además, el extracto de levadura y la interacción de los dos primeros factores mencionados fueron significativos.
- La actividad amilolítica extracelular de *Lb. acidophilus* determinada *in vitro* fue altamente a una temperatura de 35°C. Otros factores que influyeron fueron: glucosa (1%), y las ausencias de citrato y treonina.
- No se detectó actividad de amilasa extracelular en los cultivos de *Pd. pentosaceus*.
- En cuanto a la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus* en los cultivos axénicos de almidón, los factores que influyeron con alta significancia fueron: la

temperatura de incubación de 28°C, la presencia de glucosa (1%), de extracto de levadura y de CaCO<sub>3</sub> (0.03%) en el medio.

- El citrato no afectó la producción de diacetilo por *Pd. pentosaceus*, a pesar de haber sido asimilado.

#### CULTIVOS AXÉNICOS MIXTOS EN ALMIDÓN

- En los cultivos axénicos mixtos de almidón la mejor temperatura para la producción de diacetilo fue de 32°C. El consumo de almidón fue muy bajo en toda la serie, explicado probablemente por la acidificación excesiva.
- En los cultivos mixtos de almidón la concentración de diacetilo fue más elevada que la observada normalmente en los productos lácteos fermentados, mientras que las de los A.G.V fueron convenientemente bajas.
- Se determinó que *Pd. pentosaceus* y *Lb. acidophilus* eran capaces de producir amilasas ligadas a la pared celular que no habían sido evaluadas previamente. Sus actividades fueron de 47.32 y 6.16, U/l, respectivamente. *Lb. acidophilus* produjo además una amilasa extracelular con actividad más alta de 4 187.3 U/l.

#### CULTIVOS MIXTOS EN MAÍZ

- Se produjo significativamente más ácido láctico en medios preparados con una nixtamalización de 5 min, realizando desengrasado parcial del harina y con efecto

de la interacción de la nixtamalización mencionada con una molienda gruesa (partícula > malla 40 y > malla 20). La producción de ácido láctico se prefirió en un nivel moderado.

- Se determinaron las condiciones de pretratamiento que produjeran un bajo nivel de este compuesto. Los factores significativos fueron: nixtamalización, 20 min y falta de desengrasado en el harina.
- Las condiciones de pretratamiento de maíz influyeron en la fermentación láctica de los cultivos mixtos para la producción de diacetilo se incrementó en los cultivos que habían sufrido desengrasado parcial del harina y cocimiento de 25 min.
- Las condiciones de pretratamiento de maíz seleccionadas fueron: nixtamalización, 20 min (concediendo en este caso mayor importancia a la baja producción de ácido butírico); molienda fina para obtener un producto de agradable consistencia, con tamaño de partícula < malla 40; desengrasado y cocimiento del harina durante 25 min.
- La adición de extracto de levadura fue altamente significativa en la producción de diacetilo en los cultivos de maíz. Otro factor importante pero con menor significancia fue la relación de las cepas en el inóculo: *Pd. pentosaceus* / *Lb. acidophilus*, 3:1.
- La utilización de la metodología de Taguchi como herramienta estadística para diseñar los experimentos y analizar los efectos de los factores resultó válida y apropiada para cumplir con los objetivos planteados. El número de experimentos se redujo drásticamente y eso permitió evaluar un elevado número de factores e

interacciones. Aunque es frecuente utilizar diseños factoriales truncados en el área de la Biotecnología, la aplicación de la metodología de Taguchi en esta área fue novedosa.

## CINÉTICA DE CULTIVOS MIXTOS EN MAÍZ.

- Se observaron dos periodos de consumo de carbohidratos totales. La máxima velocidad de consumo se presentó durante las primeras 24 h ( $-1.28 \text{ g}_{C.T}/(l \cdot h)$ ). La segunda, más lenta, se prolongó hasta las 96 h. La concentración de azúcares reductores descendió a una velocidad de  $-0.91 \text{ g}_{A.R}/(l \cdot h)$  durante las primeras 48 h, hasta una concentración residual de 30.63 g/Kg.
- Durante el cultivo se detectando tres grupos microbianos: Las bacterias lácticas (sin diferenciar) se desarrollaron durante las 120 h, predominando sobre otras. *Bacillus* spp. aparecieron durante las primeras 48 h de cultivo y las Enterobacterias, que se observaron periódicamente a lo largo del cultivo.
- El contenido de humedad fue de 78%, manteniendo siempre un valor de actividad de agua ( $a_w$ ) suficientemente elevado ( $> 0.995$ ) para no ser inhibitorio para los microorganismos.
- La máxima producción de diacetilo se dio a las 12 h, coincidiendo con la fase exponencial de crecimiento de las bacterias lácticas. Después de las 12 h, la concentración de diacetilo bajó drásticamente hasta las 24 h, y a partir de ese tiempo se mantuvo constante.

- La formación de ácido láctico tuvo dos períodos. La velocidad máxima de producción se presentó durante las primeras 24 h. El período más lento se prolongó hasta las 84 h de cultivo. Durante el primer período el pH bajó a 4.48, y el potencial eléctrico subió a 154 mv.
- La formación de los tres A.G.V. analizados siguieron cinéticas diferentes. La concentración de ácido acético aumentó desde el inicio hasta las 96 h. El ácido propiónico empezó a acumularse a partir de las 12 h, hasta alcanzar un máximo a las 96 h. El ácido butírico se mantuvo más o menos constante durante todo el cultivo, lo que comprueba que sí pudo controlarse su producción con los factores seleccionados.
- Con los cultivos axénicos de almidón, propuestos como modelos de fermentación, se lograron determinar los principales efectos de las condiciones de cultivo en la utilización de almidón y en la producción de diacetilo. Luego, en un sistema más complejo como es la masa de maíz nixtamalizada, se identificaron algunos parámetros adicionales de cultivo que afectaron positivamente la producción de diacetilo. Bajo estas condiciones es posible obtener un producto semisólido con aroma complejo tipo mantequilla y con contenido de bacterias lácticas con actividad probiótica. Este producto puede ser de interés para la industria alimentaria.

## RECOMENDACIONES

Si se controlan la contaminación microbiana, los factores ambientales y la composición de un medio que favorece probablemente a la enzima diacetil reductasa, la producción de diacetilo podría continuar por más tiempo, elevando su rendimiento.

El pH inicial de los medios debe ser de 6.0 aproximadamente. Se ha demostrado que para favorecer el desarrollo acelerado de diversas bacterias lácticas aisladas de substratos amiláceos, el pH del medio debe estar entre 5 y 6. El mejor acidulante para el medio de cultivo de este trabajo sería el ácido sulfúrico, pues el ácido cítrico afecta la producción de las amilasas, de acuerdo a los resultados obtenidos en las fermentaciones en medios a base de almidón. La adición de ácido fosfórico tampoco es recomendable porque podría formar sales insolubles con el calcio.

Ya durante el cultivo, el  $\text{CaCO}_3$  adicionado podría ser el regulador parcial del pH. Este compuesto se ha utilizado también para favorecer el crecimiento celular de algunas bacterias lácticas, porque al reaccionar con los ácidos de la fermentación, libera el  $\text{CO}_2$  necesario para la síntesis de muchos aminoácidos y compuestos nucleótidos (Giraud *et al.*, 1994; Li y Chan, 1983; Louaileche *et al.*, 1993; Pompeyo *et al.*, 1993). También se ha demostrado que estimula el crecimiento de *Pd. pentosaceus* (Blickstad y Molin, 1981) y la producción de amilasas de algunos lactobacilos (Giraud *et al.*, 1994; Li y Chan, 1983; Pompeyo *et al.*, 1993).

El sistema de fermentación desarrollado podría ser modificado para adaptarlo a otros substratos amiláceos, como harina de trigo, fécula de maíz, harina de amaranto o de leguminosas. También podrían probarse otras cepas lácticas amilolíticas productoras de aromas diversos, para desarrollar otras materias primas aromatizadas.

Es recomendable caracterizar el producto obtenido con parámetros bromatológicos, sensoriales, sanitarios, nutricios y toxicológicos, como primera etapa de algunos desarrollos tecnológicos. También se debe determinar la viabilidad económica de los procesos desarrollados, considerando por separado el producto intermediario con aroma a mantequilla, y la utilización de éste en la formulación de alimentos procesados, como: bebidas, botanas, productos de repostería o confitería, pudines, helados, productos lácteos modificados, pastas, etc. La presentación comercial de este producto intermediario podría ser semisólida cuando se deseara conservar viables a las bacterias lácticas, o podrían ofrecerse presentaciones deshidratadas o extruídas, con el cuidado de conservar un nivel aceptable de aroma.



**ANEXOS**



## ANEXO 1

### FUNDAMENTOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Las series de cultivos en medios de almidón y en medios de maíz fueron diseñadas como experimentos factoriales fraccionados y equilibrados (E.F.F.E.), de acuerdo a la metodología de Taguchi (Ross, 1989). Las matrices diseñadas por Taguchi están estructuradas con sólo una parte de todas las posibles combinaciones de los factores, pero manteniendo un arreglo ortogonal (A.O.), es decir, equilibrado. Esto permite aplicar tratamientos estadísticos capaces de estimar los efectos de los factores principales y de algunas de las interacciones en las variables de respuesta seleccionadas, con la ventaja de que se realiza un reducido número de experimentos.

Taguchi (Ross, 1989) recomienda realizar la primera serie de experimentos evaluando un número amplio de factores, con dos niveles de variación. Estos se seleccionan en base a la experiencia previa en el campo de estudio. El nivel de resolución del diseño podría ser alto y definir todos los efectos principales y las interacciones (nivel 1), pero el número de experimentos aumentaría; por lo que generalmente se selecciona un nivel de resolución más bajo (nivel 2), dejando las

interacciones bifactoriales confundidas en el diseño. De acuerdo a este procedimiento, cada factor que se evalúa se asigna a una columna de un A.O. en orden de importancia, identificándolos con letras: A, B, C, etc. Para poder asignar los factores e interacciones de manera válida a las columnas del A.O. se diseña primero una gráfica lineal y se consulta la tabla triangular correspondiente a cada A.O. Esta metodología permite que los grados de libertad del error de la varianza sean transmutados por grados de libertad de los factores; por esa razón, el número de experimentos que hay que realizar (renglones del A.O.) es pequeño, y es igual al número de columnas menos uno

Los datos de las variables de respuesta de cada A.O. se analizan conduciendo un A.N.O.V.A. simplificado que también diseñó Taguchi (Ross, 1989). Esta metodología permite que las columnas de los factores que no tienen influencia significativa en la prueba F preliminar, se transformen en columnas de varianza del error. Al aumentar sus grados de libertad asociados, se consigue definir mejor los factores e interacciones significativos de la serie. La hipótesis nula ( $H_0$ ) considera que las varianzas estimadas de las muestras son iguales, mientras que la hipótesis alterna ( $H_a$ ) las considera diferentes; ambas, bajo determinado nivel de confianza.

Otro análisis que puede calcularse es la porción de la variación total atribuida a cada factor o interacción significativo, llamado contribución porcentual ( $P$ , %). También es importante calcular las ecuaciones que predicen el valor medio de cada variable de respuesta, que se obtendría al aplicar las mejores condiciones experimentales. La estimación de estas medias depende de la suma de los efectos

causados por los factores e interacciones significativos, como se ejemplifica en la ecuación 1 (Ross, 1989).

$$\mu_i = \bar{F}_{1\#N} + \bar{F}_{2\#N} + \dots + \bar{F}_{n\#N} - g.l. (\mu_{Total}) \dots \dots \dots (1)$$

Donde:

$\mu_i$  = Promedio del valor esperado de cierta variable de respuesta bajo condiciones seleccionadas.

$\bar{F}_1$  = Promedio de todos los datos de cierta variable de respuesta bajo el mejor nivel de un factor (o interacción) significativo (F). El subíndice (# N) es el número de nivel de ese factor.  $\bar{F}_2 \dots \bar{F}_n$  son como  $\bar{F}_1$ .

*g. l.* = Grados de libertad (suma de elementos, factores o interacciones - 1), usados para estimar la media.

El nivel 1 de una interacción significa que los dos factores involucrados están en el mismo nivel, mientras que el nivel 2 se refiere a que los niveles de cada factor es diferente.

Con los resultados del análisis estadístico de cada serie se diseñan las series consecutivas, evaluando más finamente los factores que resultaron más significativos, o introduciendo efectos nuevos.



## **ANEXO 2.**

### **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

#### **SOLUCIONES PARA LOS CULTIVOS MICROBIANOS.**

##### **SOLUCIÓN DE VITAMINAS Y MINERALES PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO.**

Se disolvieron 640  $\mu\text{g}$  de biotina, 320  $\mu\text{g}$  de ácido fólico en 40 ml de una solución etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  1:4, v/v. Después se dispersaron una cápsula de Viterra-Plus<sup>®</sup> y una de Calanda<sup>®</sup> en la solución y la suspensión se filtró a través de algodón.

##### **SOLUCIÓN DILUYENTE ESTÉRIL DE FOSFATOS.**

Se disolvieron 8 g de NaCl, 0.34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1.21 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 1000 ml de agua destilada. Se ajustó el pH de la solución a 7.3 y se distribuyó en frascos de dilución (99 ml c/u) y tubos de cultivo con tapón de rosca (9 ml c/u). El material se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

## SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN FOTOCOLORIMÉTRICA DE DIACETILO.

### SOLUCIÓN DE KOH AL 1% Y CREALININA.

Se disolvieron 10 g de KOH y 3 g de creatinina en 1000 ml de agua desionizada hervida y fría. Se guardó la solución al abrigo de la luz.

### SOLUCIÓN DE $\alpha$ -NAFTOL.

Se disolvieron 10 g de  $\alpha$ -naftol en 300 ml de etanol de 96° G.L. Se mezcló la solución con 200 ml de agua desionizada, luego se clarificó con carbón activado y se filtró a través de papel filtro. La solución se guardó al abrigo de la luz a 4°C por no más de 3 días.

### SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE DIACETILO.

Se pesaron 60 mg de diacetilo y se disolvieron en 1000 ml de agua desionizada. La solución se guardó al abrigo de la luz a 4°C por no más de 3 días.

## **SOLUCIONES PARA EL ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA GASEOSA.**

### **SOLUCIONES CONCENTRADAS DE DIACETILO Y DE A.G.V.**

Se prepararon por separado soluciones concentradas (100  $\mu\text{mol/l}$ ) de diacetilo (Merck-Shuchardt, >98%), ácido acético (Baker Analyzed, 99.87%), ácido propiónico (Merck, >99%) y ácido butírico (Baker Analyzed, purificado) en agua desionizada. Las soluciones se guardaron en congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **SOLUCIÓN DE HCl.**

Se disolvieron 50 ml de HCl grado reactivo en 50 ml de agua desionizada. La solución se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **SOLUCIÓN ESTÁNDAR MIXTA DE DIACETILO Y A.G.V.**

De las soluciones concentradas se tomaron alícuotas convenientes para preparar un ml de cada solución mixta con 1, 3, 5 ó 10  $\mu\text{mol/l}$  de cada compuesto, para lo cual se utilizaron viales de 2 ml. Las soluciones se acidificaron hasta un pH de 2.0, adicionando 50  $\mu\text{l}$  de la solución de HCl. Finalmente, el volumen en cada vial se llevó a 1 ml con agua desionizada. Las soluciones estándares mixtas se prepararon un día antes de su uso, guardando los viales a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## **SOLUCIONES PARA LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS Y RUPTURA DE CÉLULAS.**

### **SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS 0.05 M.**

Se disolvieron: 0.0275 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 1.3530 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, y se ajustó el pH a 5.5.

### **SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS 0.2 M.**

Se disolvieron 0.11 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 5.412 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1000 ml de agua desionizada, y se ajustó el pH a 5.5 (Sen y Chakrabarty, 1984; Shimazu *et al.*, 1985).

### **SOLUCIÓN DE ALMIDÓN EN BUFFER DE FOSFATOS 0.05 M.**

Se dispersaron 0.72 g de almidón soluble en 500 ml de buffer de fosfatos 0.05 M. La solución se calentó hasta gelatinización del almidón, se enfrió y se aforó a 1000 ml con el mismo buffer. Se conservó esta solución a 4°C por no más de un día.

### **SOLUCIÓN DE ALMIDÓN EN BUFFER DE FOSFATOS 0.2 M.**

Se preparó igual que la solución anterior, pero en buffer de fosfatos 0.2 M.

**SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE GLUCOSA EN BUFFER DE FOSFATOS 0.05 M.**

Se disolvieron 4.5 g de glucosa en 1000 ml de buffer de fosfatos 0.05 M. Se guardó por no más de un día a 4°C.

**SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE GLUCOSA EN BUFFER DE FOSFATOS 0.2 M.**

Se preparó un solución de glucosa de manera similar a la anterior, pero con una concentración de 1.1 g en 1000 ml de buffer de fosfatos 0.2 M.



## ANEXO 3

### ELABORACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Pd. pentosaceus* Y DE *Lb. acidophilus* EN CULTIVOS SUMERGIDOS DE GLUCOSA.

#### PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS.

Estos cultivos se realizaron con el objetivo de caracterizar las curvas de crecimiento de las bacterias lácticas por medio de tres distintos parámetros. Se utilizó un caldo de glucosa preparado de manera similar al caldo de almidón para los inóculos, salvo que se omitieron el almidón y el  $\text{CaCO}_3$ , además de que la concentración de glucosa se incrementó a 15 g/l.

Los matraces con caldo estéril se inocularon con asadas cargadas de cultivos axénicos de conservación de *Pd. pentosaceus* o de *Lb. acidophilus* y se incubaron a 32°C, agitando a 120 r.p.m. En cada cultivo se realizó un muestreo aséptico cada 4 h durante 48 h, para determinar crecimiento microbiano por: turbidez, peso de biomasa seca y cuenta viable en placa. Los cultivos y los análisis se realizaron por duplicado.

## CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIANO.

### CUENTA VIABLE DE BACTERIAS LÁCTICAS.

De los cultivos sumergidos se tomaron asépticamente muestras de 1 ml por duplicado, y se procedió a determinar la cuenta viable siguiendo la metodología indicada en el capítulo de Métodos. La curva de cuenta viable de *Pd. pentosaceus* contra el tiempo se presentan en la Fig. 24, y la de *Lb. acidophilus*, en la Fig. 25.

### DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ DEL CALDO DE CULTIVO.

Para determinar la turbidez de los cultivos axénicos se midió la absorbancia de muestras de caldo a 600 nm en un espectrofotómetro JENWAY modelo 6105 U.V./Vis, habiendo calibrado con caldo no inoculado. Las curvas de crecimiento de *Pd. pentosaceus* y de *Lb. acidophilus* se presentan en las Figs. 24 y 25, respectivamente.

### DETERMINACIÓN DE BIOMASA SECA.

El peso de la biomasa seca de esos mismos cultivos se cuantificó filtrando alícuotas de caldo a través de membranas estériles Mullipore®, con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Cada microfiltro con biomasa se secó a 90°C hasta peso constante y el peso de la biomasa

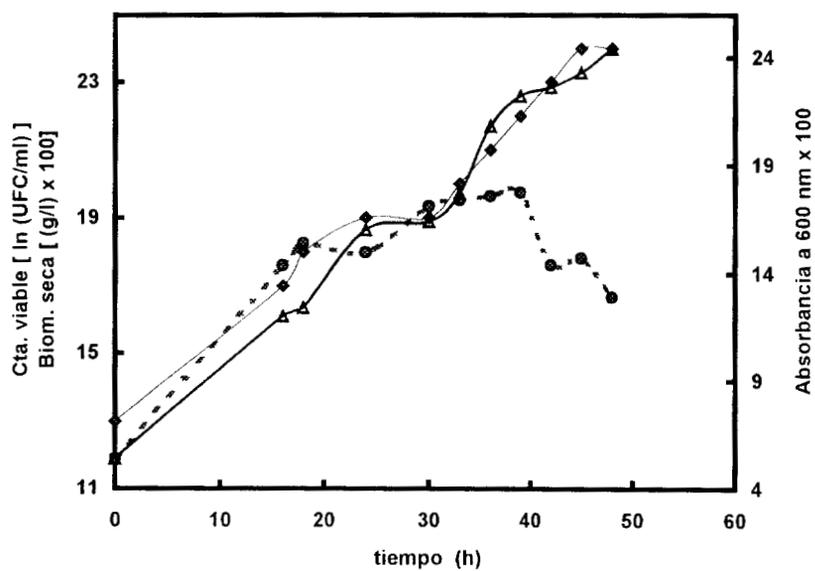


Fig. 24 Curvas de crecimiento de *Pd. pentosaceus* en medio de glucosa. Cultivo axénico para inóculo

—●— Ln (UFC/ml) —◆— X (g/l) x 100 —▲— Abs. x 100

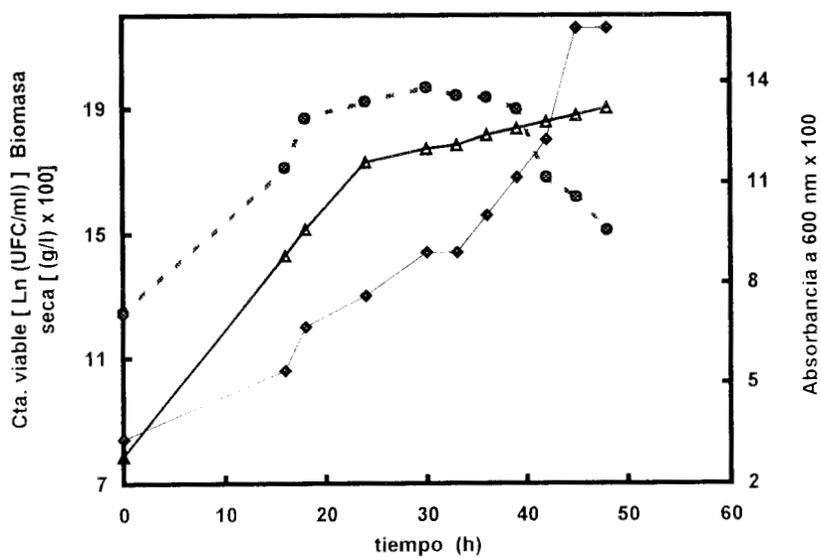


Fig. 25 Curvas de crecimiento de *Lb. acidophilus* en medio de glucosa. Cultivo axénico para inóculo

- ● - Ln (UFC/ml) - ◆ - X (g/l) x 120 —▲— Abs. x 100

seca se calculó por diferencia de peso. Los resultados también fueron graficados en la Fig. 24 para *Pd. pentosaceus* y en la 25 para *Lb. acidophilus*.

### **CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE CADA CEPA EN LOS INÓCULOS PARA LOS CULTIVOS EN MAÍZ.**

Se prepararon posteriormente cultivos axénicos de 36 h en medio de glucosa para iniciar los cultivos mixtos de la 2ª Serie de maíz, y para los estudios cinéticos en masa de maíz. Para cuantificar la biomasa se determinaron primero las absorbancias de los caldos axénicos; luego, esos valores se correlacionaban con las curvas de cuenta viable y de biomasa seca realizadas para *Pd. pentosaceus* (Fig. 24) y para *Lb. acidophilus* (Fig. 25). Con los datos leídos se calcularon los volúmenes de los caldos de glucosa requeridos para proporcionar la cantidad de microorganismos deseados, según el diseño experimental.



## ANEXO 4

### ARTÍCULOS PUBLICADOS

Se anexan las copias de los siguientes artículos científicos derivados de este trabajo:

- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosio, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J. 1996a. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38 (2): 129-137.
- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosío, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J. 1996b. Importancia del diacetilo en los aromas producidos por fermentación láctica. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*. 31 (2): 16-22.
- Escamilla, M.L., Valdés, S., Soriano, J. y Tomasini, A. 2000. Effect of some nutritional and environmental parameters on the production of diacetyl and starch consumption by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.* (En prensa).



REVISTA  
LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA

---

ABRIL • JUNIO • 96



**REVISTA LATINOAMERICANA DE  
MICROBIOLOGIA**  
ORGANO DE LA ASOCIACION LATINOAMERICANA DE  
MICROBIOLOGIA



---

PATROCINADORES  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE APOYO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCION DE GRADUADOS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

---

**Editada por la Asociación Mexicana de Microbiología**

**Dirección: Carpio y Plan de Ayala, 11340 México, D.F. MEXICO**

**Correspondencia: Apartado Postal 4-862, 06400 México, D.F., MEXICO**

**Periodicidad: Se publica un volumen anual con cuatro números que salen al inicio de enero, abril, julio y octubre**

# REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA

Vol. 38 No. 2 pp. 65-166

## EDITOR HONORARIO:

Adolfo Pérez Miravete

## EDITOR:

Jorge Ortigoza Ferado

## CONSEJO DIRECTIVO:

Emiliano Cabrera Juárez

Manuel V. Ortega

---

## CONSEJO EDITORIAL

Ariel Alvarez Morales  
 Carlos F. Arias Ortiz  
 Blanca Lilia Barrón Romero  
 David Bessudo Madjar  
 Emiliano Cabrera Juárez  
 Jorge Fernando Calderón Jiménez  
 Edmundo Calva Mercado  
 Rosa Olivia Cañizares Villanueva  
 Guillermo Carvajal Sandoval  
 Heliodoro Celis Sandoval  
 Michael Joseph Colston  
 Carlos J. Conde González  
 Roberto Coria Ortega  
 Pablo Correa Girón  
 Everardo Curiel Quesada  
 Mireya de la Garza Amaya  
 Rosa María del Angel Núñez  
 María Mayra de la Torre Martínez  
 Georges Dreyfus Cortés  
 Gabriela Echaniz Avilés  
 José Edgardo Escamilla Marván  
 Alejandro Escobar Gutiérrez  
 Fernando Esparza García  
 Elda Guadalupe Espín O.  
 Bertha J. Espinoza Gutiérrez  
 Clara Inés Espitia Pinzón  
 Sergio Estrada Parra  
 Ronald Ferrera Cerrato  
 Yolanda Fuchs Gómez  
 Enrique Galindo Fentanes  
 Alejandro García Carrancá  
 Ethel García Latorre

Silvia Giono Cerezo  
 Beatriz Gómez García  
 Alicia González Manjarrez  
 Teodoro Gutiérrez Castrejón  
 Wilhelm Hansberg Torres  
 Pascal Héron Scohy  
 Ricardo Hernández Delgadillo  
 Tomás Hernández Méndez  
 César Hernández Rodríguez  
 Carlos Huitrón Vargas  
 Luis Jiménez Zamudio  
 Juan Pedro Laclette San Román  
 Edmundo Lamoyi Velázquez  
 Carlos Larralde Rangel  
 Jesús Manuel León Cazares  
 Susana López Charretón  
 Ahidé López Merino  
 Agustín López-Munguía Canales  
 Vicente Madrid Marina  
 Raúl Mancilla Jiménez  
 Agustín Martínez Ramos  
 Ana Ma. Mesta Howard  
 Isaura Meza Gómez-Palacio  
 José Luis Molinari Soriano  
 Antonio Morilla González  
 Lydia Mota de la Garza  
 María de Lourdes Muñoz  
 José Luis Muñoz Sánchez  
 Benjamín Noguera Torres  
 Guadalupe Ortega Pierres  
 Jorge Ortigoza Ferado  
 Librado Ortiz Ortiz

Antonio Peña Díaz  
 Adolfo Pérez Miravete  
 Ruy Pérez Montfort  
 Guillermo Pérez Pérez  
 Enriqueta Pizarro Suárez  
 Héctor M. Poggi Varaldo  
 María Teresa Ponce Noyola  
 Celso Ramos García  
 Sergio Sánchez Esquivel  
 Federico E. Sánchez Rodríguez  
 Horacio Sandoval y Trujillo  
 Leopoldo Santos Argumedo  
 Edda Sciutto Conde  
 Luis Servín González  
 Jesús Silva Sánchez  
 Gloria Soberón Chávez  
 Patricia Talamás Rohana  
 María Lucía Taylor  
 Victor Tsutsumi Fujiyoshi  
 Salvador Uribe Carvajal  
 María Valdés Ramírez  
 Lourdes Villa Tanaca  
 Héctor Villalva Posada  
 Samuel Zinker Ruzal

## REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA

### Instrucciones a los autores

Se suplica a los autores se ajusten tan estrictamente como les sea posible a las instrucciones que se dan a continuación para la publicación de sus trabajos en cada Revista. El incumplimiento causa retrasos en la evaluación, revisión y preparación del material para publicación.

1. **IDIOMAS.** La Revista acepta trabajos escritos en español, portugués o inglés. En el caso de trabajos escritos en español o en portugués, deberá incluirse el título y un resumen en inglés, hasta de 200 palabras.

2. **NATURALEZA DEL TEXTO.** El autor deberá indicar, conforme recomiendan la UNESCO, el Consejo Internacional de Uniones Científicas, la Federación Internacional de Documentos, etc. (UNESCO/NS/177, 1962), en qué categoría de las publicaciones científicas originales deberá clasificarse su texto:

a) *Memorias científicas originales.* Cuando está redactado en tal forma que un investigador competente suficientemente especializado en la misma rama de la ciencia pueda, basándose exclusivamente en las indicaciones que figuran en este texto (1) repetir los experimentos y obtener los resultados que se describen; (2) repetir las observaciones y juzgar las conclusiones del autor; (3) verificar la exactitud de los análisis y deducciones que le han permitido al autor llegar a sus conclusiones.

b) *Notas preliminares.* Cuando, si bien aporta una o varias informaciones científicas nuevas, su redacción no permite a sus lectores verificar esas informaciones en las condiciones indicadas en el párrafo anterior.

c) *Estudios recapitulados o revisiones.* No contienen informaciones científicas originales nuevas; reúnen, analizan y discuten informaciones ya publicadas relativas a un solo tema.

### 3. REDACCIÓN DEL TEXTO

a) El título de toda publicación deberá ser lo más corto posible, siempre que contenga las palabras claves del trabajo de manera que permita identificar la naturaleza y contenido de éste aun cuando el título se publique aislado del texto en citas e índices bibliográficos. No utilizar abreviaturas en el título y hacerlo con la máxima discreción en el texto.

b) A continuación irán el nombre del autor o los autores, el sitio en que se hizo el trabajo y la dirección.

c) La sintaxis será lo más sencilla posible y las palabras utilizadas deberán encontrarse en un diccionario corriente. Cuando no pueda satisfacerse este requisito, el autor comprobará si los neologismos que pretende utilizar pertenecen al vocabulario científico y técnico internacional.

Al redactar el texto, se evitará omisión total o parcial de los métodos empleados o de los resultados importantes. Si por motivos de propiedad industrial u otros, el autor debe limitar las informaciones científicas que desea publicar sobre el tema que le ocupa, el texto se presentará como perteneciente a la categoría (b) *Notas preliminares.*

En ningún caso se darán argumentos o pruebas que se basen en comunicaciones privadas o en publicaciones de difusión limitada.

En la redacción, se respetarán las normas internacionales relativas a las abreviaturas, al orden de las citas bibliográficas, a los símbolos, a la nomenclatura anatómica, zoológica, botánica, química, etc., a la transliteración, terminología, sistema de unidades, etc.

Siempre que sea posible, el trabajo será redactado haciendo destacar las siguientes secciones:

3.1 *Introducción:* deberá establecer con claridad el objetivo del trabajo y sus relaciones con otros publicados anteriormente sobre el tema en estudio. Se evitarán extensas revisiones de la literatura así como el redactar esta parte como si fuera una exposición analítica.

3.2 *Material y métodos:* en donde se relata lo que fue realizado, mencionando los materiales empleados para ello. Los métodos nuevos y los materiales poco usuales se describen en detalle; los demás se describirán con brevedad, o mejor aún, se dará la referencia bibliográfica correspondiente.

3.3 *Resultados:* serán presentados sólo los obtenidos en el trabajo que se relata, con el mínimo posible de discusión o de interpretación personal. Cuando sea posible serán presentados bajo la forma de tablas, gráficas, dibujos o fotografías, pero se evitará toda duplicidad inútil.

3.4 *Discusión:* comprenderá exclusivamente la discusión de los resultados obtenidos en el trabajo correspondiente, su significación, relación con resultados obtenidos por otros autores, y posibles implicaciones. Se evitarán las hipótesis que no estén basadas en los datos del trabajo del autor.

3.5 *Resúmenes:* es indispensable que el trabajo venga con dos resúmenes redactados por el autor, de conformidad con las recomendaciones divulgadas por la UNESCO (documentos NS/38.D.10a). El primero será en el mismo idioma del texto; sólo excepcionalmente podrá tener más de 200 palabras. El segundo resumen estará en inglés; en el caso de que el texto esté en inglés, el segundo resumen estará en español o portugués. Cada resumen deberá tener el título en el idioma correspondiente.

La forma de expresión comprenderá frases completas, en estilo claro, simple y conciso. Ha de darse por supuesto que el lector posee cierto conocimiento del tema pero que no ha leído el artículo. Por consiguiente el resumen habrá de ser inteligible por sí mismo sin que haya necesidad de referirse al texto del trabajo. Como el título del trabajo acompañará siempre al resumen, la fase inicial de éste deberá evitar una repetición de conceptos.

En ocasiones conviene indicar la forma en que está tratado el tema con palabras como: conciso, exhaustivo, teórico, etc.

Se indicarán los hechos observados, las conclusiones y, de ser posible, los elementos esenciales de cualquier teoría, método o aparato nuevo; se llamará la atención sobre nuevos compuestos especiales y cualesquiera datos numéricos nuevos, tales como las constantes físicas. Es importante referirse a los nuevos puntos y observaciones, aun cuando puedan

ser incidentes en relación con la finalidad capital del artículo, de lo contrario esta información corre peligro de pasar inadvertida.

Cuando presente resultados experimentales, deberá indicar el método empleado y, si éste es nuevo, se darán los principios fundamentales, el tipo de operación y el grado de exactitud. Se evitarán frases como "se discuten los resultados", "se presentan hipótesis", "se dan datos sobre".

3.6 **Referencias bibliográficas.** El arreglo bibliográfico de los trabajos científicos se realizará ordenando en forma alfabética numérica por autores y su presentación será en una lista al final del trabajo. En el texto, las referencias se citarán con números índices correspondientes a los números de ordenación de la lista bibliográfica.

Para la presentación de las citas se adoptarán las siguientes normas:

a) para artículos de publicaciones periódicas: (1) apellido e iniciales del primer autor, (2) iniciales y apellidos de los coautores separados por punto y coma (;) y el último precedido por el símbolo &, (3) año de publicación, (4) título del trabajo, (5) nombre de la revista abreviado de acuerdo con *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, 1974), (6) volumen, página inicial y página final.

b) para libros: (1) apellido e iniciales del autor, (2) iniciales y apellidos de los coautores separados por punto y coma (;) y el último precedido por el símbolo &, (3) año de publicación, (4) título del libro, páginas precedidas por p. y separadas por un guión, (5) número de edición si no es la primera, (6) casa editora, si el editor del material escrito aparece también como autor responsable del mismo llevará después de su nombre la palabra abreviada (ed.), (7) lugar de la publicación.

c) para capítulos de libros: (1) apellido e iniciales del autor, (2) iniciales y apellidos de los coautores separados por punto y coma (;) y el último precedido por el símbolo &, (3) año de la publicación, (4) título del capítulo, (5) páginas precedidas por p. y separadas por un guión, (6) inicial y apellidos de los editores precedidos por la palabra *In:* y seguidos por (ed.), (7) título del libro, (8) número de edición, (9) casa editora y lugar de publicación.

Observar en los ejemplos la puntuación y posición:

1. LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FARR & R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
2. GRÖSCHEL, D.H.M. & B.A. STRAIN. 1991. Laboratory safety in clinical microbiology, p. 49-58. *In:* A. B. LOWS; W.J. HAUSLER, JR; K.L. HERRMANN; H.D. ISENBERG & H.J. SHADOMY (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

4. EL MANUSCRITO. Los trabajos serán lo más corto posible y solamente con autorización especial del Comité Editorial se publicarán artículos con más de 15 páginas, escritas en papel formato carta (8" × 11" ó 21.5 × 28 cm) con máquina estándar, o en computadora con un procesador de

textos Works, Word, AmiPro o Word Perfect, espacio doble y márgenes de 3 cm. Se presentarán el original y dos copias. Se recomienda escribir cada resumen y cada tabla en una hoja separada, las leyendas de las figuras estarán reunidas en una hoja aparte.

5. LAS TABLAS. Deberán estar numeradas y tener un título explicativo y deberán ser entendidas por sí mismas sin tener que recurrir al texto. Ninguna casilla quedará vacía, la ausencia de datos numéricos deberá ser representada por:

0, cuando el fenómeno ocurre pero su expresión es tan pequeña que no alcanza las unidades expresadas en la tabla;  
-, cuando el fenómeno no ocurre o cuando el dato es desconocido y no se afirma si el fenómeno ocurre o no.

6. FIGURAS. Las gráficas y dibujos deberán ser trazados con tinta china negra sobre papel blanco, albanene o hilado o presentarse en forma equivalente en impresoras laser o de inyección de tinta. Las líneas, números y letras deberán tener el grosor que permita su reducción sin perder la nitidez. No se admitirán figuras trazadas en papel milimétrico. Las fotografías deberán ser copias bien contrastadas e impresas en papel brillante, pegadas en hojas tamaño carta. Todas las figuras se enumerarán en una sola secuencia con números arábigos progresivos.

7. PUBLICACIÓN. Los editores informarán por carta a los autores sobre la recepción de manuscritos, su aceptación por el Comité Editorial, sugerencias para el perfeccionamiento del texto, etcétera.

8. COSTO. Se hará un cargo de US \$ 10 por página impresa y opcionalmente de US \$ 100 por 50 sobretiros o US \$ 150 por 100 sobretiros.

Los manuscritos y correspondencia deberán ser enviados a:

Revista Latinoamericana de Microbiología  
Apartado postal 4-862  
06400 México, D.F.  
MEXICO

Se requiere de los autores que además de su dirección proporcionen su número telefónico y de fax. Además la versión final del trabajo deberá acompañarse del diskette que contenga el texto completo en un procesador Works, Word, AmiPro, o Word Perfect en versiones recientes.

La aceptación de los trabajos dependerá del cumplimiento de los siguientes aspectos:

- aportación valiosa al conocimiento para los microbiólogos.
- planteamiento claro de objetivos.
- mostrar un conocimiento amplio de la bibliografía relacionada.
- cumplimiento de las instrucciones a los autores.

REVISTA  
LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGÍA

---

## CONTENIDO

ABRIL ● JUNIO ● 96

Rev. Lat.-Amer. Microbiol. Vol. 38 pp. 65-166

## TRABAJOS ORIGINALES

## BACTERIOLOGIA MEDICA:

Detection of *Chlamydia trachomatis* by immunofluorescence, Papanicolaou and immunoperoxidase in women with leucorrhoea. E. REYES- MALDONADO; L.A. DIAZ-FUENTE; C.V. GONZÁLEZ-BONILLA; M. ESQUER-MENDIVI; E.Z. JIMÉNEZ & I.R. DELEÓN..... 65

Biotypes of *Gardnerella vaginalis* isolated from urinary tract. ALBERTO GONZÁLEZ-PEDRAZA AVILÉS; MARIA CATALINA ORTIZ-ZARAGOZA; ALMA EDNA INZUNZA-MONTIEL & EIREN RAUL PONCE-ROSAS..... 75

Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women sexually active or not. CONSTANTINO GIL-JUÁREZ; BLANCA AURORA CALDERÓN; JAIME MONTERO; ANTONIO YAÑEZ & LILIA CEDILLO..... 81

## ECOLOGIA MICROBIANA:

Ciliatological characterization of a biological reactor that eliminates nitrogen with intermittent aeration. V.M. LUNA-PABELLO S. PLEISSON-SAUNE; E. PAUL & C. DURÁN DE BAZUA..... 89

## CONTROL Y PRODUCCION DE BIOLOGICOS:

Potency assay of diphtheria antitoxin in Vero cell microcultures. ROGELIO SÁNCHEZ GÓMEZ; ROSARIO GALLARDO Y RAMOS & MARIO GONZÁLEZ-PACHECO..... 97

## PARASITOLOGIA:

Cryopreservation of infective larvae of *Haemonchus contortus*. ENRIQUE LIÉBANO-HERNÁNDEZ; MARÍA EUGENIA LÓPEZ-ARELLANO; VÍCTOR VÁZQUEZ-PRATS & PEDRO MENDOZA DE GIVES..... 111

|                                  |  |     |
|----------------------------------|--|-----|
|                                  | Frequency of triatomines infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> collected in Cuernavaca city, Morelos, Mexico. MÁXIMO CORTÉS-JIMÉNEZ; BENJAMIN NOGUEDA-TORRES; RICARDO ALEJANDRE-AGUILAR; LUIS ISITA-TORNELL & ERNESTO RAMÍREZ-MORENO. ....  | 115 |
| <b>IMMUNOLOGY:</b>               | Antibody response to nitrogenase-positive and -negative <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains in juvenile-onset ankylosing spondylitis patients and their first degree relatives: Lack of differential recognition of the bacterial nitrogenase. VÍCTOR PARRA-CAMPOS; ALEJANDRO ESCOBAR-GUTIÉRREZ; MA. LILIA DOMÍNGUEZ-LÓPEZ; MARIO CANCINO-DÍAZ; RUBÉN BURGOS-VARGAS; JULIO GRANADOS-ARREOLA; LUIS JIMÉNEZ-ZAMUDIO & ETHEL GARCÍA-LATORRE..... | 121 |
| <b>REVIEW ARTICLES</b>           | Diacetyl formation by lactic bacteria. M.L. ESCAMILLA-HURTADO; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO; S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS.....   | 129 |
|                                  | Current facts about horse trichinellosis. CAMILA ARRIAGA-DÍAZ; LILIÁN YÉPEZ-MULIA & M. GUADALUPE ORTEGA-PIERRES.....   | 139 |
|                                  | Microsporidiosis: Current status of a new parasitosis. D. RUÍZ-SÁNCHEZ; J. T. SÁNCHEZ-VEGA & J. TAY.....   | 151 |
| <b>INVITATIONS TO CONGRESSES</b> |  |     |

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO; S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **38**:129-137, 1996.

**ABSTRACT:** Some of the most widely used products in the food industry are flavor compounds. These products can be obtained either by chemical synthesis and therefore are called synthetic or by fermentation thus called natural flavors. There is a tendency towards the use of natural products by the consumer, therefore there is an increasing industrial interest in them. One of these products is diacetyl, an important component in the flavor of butter, although others, like acetoin, acetaldehyde and 2,3-butanediol play a role in the flavor, they are present in trace amounts. The mixture of all these compounds produced during the lactic acid fermentation in suitable proportions is what gives butter its characteristic flavor. The most common metabolic route that produces diacetyl is the one starting from pyruvate, in this case it seems that the biosynthesis is related to the presence of citrate in the medium. An alternative route for the production is from acetaldehyde, in this route citrate does not seem to intervene. In the present paper a review of the mechanisms of formation of diacetyl by lactic acid bacteria, as well as the most important factors that influence the biosynthesis of this metabolite is made.

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO; S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS. Formación de diacetilo por bacterias lácticas. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **38**:129-137, 1996.

**RESUMEN:** Los aromas o sustancias aromatizantes son compuestos intermedarios empleados ampliamente en la industria alimentaria. Estos aditivos pueden ser producidos por síntesis química o naturalmente por fermentación. Últimamente los más solicitados por los industriales debido a la tendencia que tienen los consumidores hacia los productos naturales son los producidos por fermentación. El diacetilo es uno de los componentes primordiales del aroma a mantequilla, aunque también deben estar presentes otros compuestos como la acetoina, el acetaldehído y el 2,3-butanediol en menor proporción. La mezcla de todos estos compuestos, en proporciones adecuadas es lo que origina el aroma característico a mantequilla. El diacetilo, así como los compuestos de acompañamiento son producidos por la fermentación de las bacterias lácticas. La ruta metabólica, más común, de la biosíntesis del diacetilo es a partir del piruvato. En este caso la biosíntesis del diacetilo depende de la presencia de citrato en el medio. Otra ruta alternativa es a partir del acetaldehído, en esta ruta parece que no interviene el citrato. En este trabajo se hace una revisión de los mecanismos de formación del diacetilo por bacterias lácticas, así como de los factores más importantes que influyen en la biosíntesis de este metabolito.

# Diacetyl Formation by Lactic Bacteria.

M.L. ESCAMILLA-HURTADO<sup>1</sup>; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO<sup>1</sup>; S. VALDÉS-MARTÍNEZ<sup>2</sup> & J. SORIANO-SANTOS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535. C.P. 09340. Iztapalapa, D.F. MEXICO.  
<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Campus-I. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Edo México. MEXICO.

## INTRODUCTION

Diacetyl or 2,3-butanedione (CH<sub>3</sub>COCOCH<sub>3</sub>), is widely used in the food industry because it is one of the flavor substances in butter. Diacetyl may be obtained through chemical synthesis and is part of the formulation of artificial flavors of butter, cheese, caramel, coffee, strawberry and milk shakes<sup>17,41</sup>. However, complexity of flavors pose a difficulty in obtaining an artificial flavor which has a natural taste. Besides there is the fact that consumers tend to prefer natural products. This is leading the food industry towards the use of naturally produced flavors. Diacetyl is obtained through fermentation as a metabolic product of certain lactic bacteria. In this instance, besides diacetyl which is the main product, other metabolites are produced which together give the butter flavor. In this fashion one can obtain this flavor without the addition of other substances. This is the basis of the interest in flavors and tastes produced by biotechnological processes, and called "reaction flavors". The great advantage of reaction flavors and tastes lays in the exact reproduction of the natural ones<sup>2,4</sup>. Diacetyl biosynthesis by lactic bacteria has been studied mainly in dairy products and to a lesser extent in alcoholic beverages and some vegetables. Improved microbial strains, optimization of the biological process parameters as well as methods of extraction and concentration are available to both industry and researchers<sup>37,44</sup> but it is still necessary to advance in the biotechnological knowledge in order to completely control the diacetyl

production and that of the accompanying compounds<sup>6,14</sup>. This review deals with the study of the biosynthesis and the mechanisms involved in the formation of diacetyl by lactic bacteria.

#### BIOCHEMICAL MECHANISMS FOR THE FORMATION OF DIACETYL BY LACTIC BACTERIA

**Milk:** Certain bacteria which satisfy their energy needs with an efficient substrate, may form diacetyl if another carbon source is simultaneously assimilated. This kind of metabolism was initially observed in milk substrates because of its importance in the food industry. It has been observed in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (formerly *Streptococcus diacetylactis*), *Leuconostoc cremoris* (formerly *L. citrovorum*), *L. lactis* and other lactic bacteria when simultaneously consuming citrate and lactose (or added glucose), form an excess of pyruvate. Excess pyruvate is not used to recover NAD<sup>+</sup>, but it is transformed in diacetyl through oxidative decarboxylation of the intermediary acetolactic acid and the participation of thiamine pyrophosphate (TPP)<sup>3,8,9,20,34,36</sup>. An alternate path in diacetyl biosynthesis is from acetaldehyde to acetoin and acetyl-coenzyme A, skipping acetolactate<sup>34</sup>. Figure 1 shows two possible pathways in diacetyl formation.

The rate of reaction for the first pathway is intimately related with the efficiency of the citrate transport system at the membrane<sup>26,28</sup>. Citrate stimulates glucose consumption by *Lactococcus* spp. and *Leuconostoc* spp. with a consequent increase in growth rate probably because citrate favors the biosynthesis of some cell constituents<sup>7,10,40</sup>. Diacetyl

formation is accompanied by the appearance of other compounds such as acetoin, 2,3-butanediol and acetaldehyde.

**Wines:** Various lactic bacteria produce similar amounts of the diverse volatile compounds during malolactic fermentation, with little differences in the diacetyl, acetoin and ethyl succinate levels<sup>43</sup>. The yield of these compounds has been related to the malolactic fermentation rate<sup>31</sup>. A close relationship has been observed between citrate consumption and diacetyl formation during malolactic fermentation. Diacetyl formation in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactosum*, involves transformation of citrate to oxalacetate by the enzyme citrate lyase, then pyruvate and acetolactate and finally diacetyl with TPP participation<sup>45,47</sup> (Fig. 1).

The presence of malate diminishes the assimilation rate of citrate in cultures of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus brevis*, probably due to a common carrier at the plasma membrane which favors malate<sup>31</sup>. Another metabolic finding in *Leuconostoc mesenteroides* is that during malolactic fermentation it derives energy from malate degradation even in the presence of simple sugars since the assimilation rate of sugars is inhibited in acid environments<sup>11</sup>. Once bacteria have satisfied their energy needs they start assimilating the citrate in the wine, forming an excess of pyruvate which then is transformed in diacetyl without energetic change, as it occurs in milk.

Cider is another example of citrate consumption by malolactic bacteria starting between five and sixty hours after fermentation begins. This kind of metabolism contributes to the development of pleasant flavors<sup>33</sup>.

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO; S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996.

On the other hand, there are clues that point to the fact that citrate is not the only pathway for diacetyl formation in wine, since it has been observed that *Pedococcus cerevisiae* is able to form this metabolite without consuming citrate, the metabolic route is unknown, though<sup>47</sup>.

#### DIACETYL DEGRADATION

The enzymes that reduce diacetyl and acetoin are not alike in different organisms. In strains isolated from milk it was found that the enzymes formed by *Lactobacillus* spp. and by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* are specific for NADH, whereas those of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* are specific for NADPH. Moreover, *Leuconostoc paramesenteroides* forms enzymes that can act with either coenzyme<sup>40</sup>. This is not the only pathway for diacetyl degradation. Some strains (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), isolated from milk and butter, which lack diacetyl reductase produce an unidentified low molecular weight metabolite responsible for reduction of diacetyl produced by other bacterial strains<sup>28</sup>. In *Leuconostoc lactis* some energetic molecules and intermediary compounds from glucose metabolism inhibit acetolactate synthetase activity in the presence of citrate and neutral pH. This effect decreases as pH decreases. The exception is ATP, whose inhibition is accentuated at low pH<sup>9</sup>.

In lactic cultures it has been observed that the membrane transport system for citrate decays with time, which gives rise to a diminished rate of diacetyl formation after 15 hours<sup>28</sup>.

A stage of increase of diacetyl production has been observed in several foods lasting 12 to 24 hours to be followed by a slow decrease even if the microbial growth continues, in contrast with the rate of acetaldehyde formation which is closely related with the microbial growth<sup>35</sup>. This behavior has been evidenced during the mesophilic and thermophilic fermentation of milk<sup>35</sup>, to obtain ghee, an hindu food made of milk fat<sup>48</sup>, and dhokla<sup>22</sup>. Nevertheless, in corn meal fermentation<sup>15,16</sup> and in cabbage<sup>35</sup>, diacetyl formation goes on for several days as growth proceeds uninterruptedly, afterwards diacetyl concentration diminishes.

Diacetyl reduction by enzymes from *Lactobacillus brevis* and *L. hilgardii* begins during malolactic fermentation and continues during the storage period which gradually diminishes diacetyl. This reaction usually occurs also with the reductases formed by yeast<sup>12</sup>.

Diacetyl disappears from wines when pH is below 5.2 because two enzymes, diacetyl reductase and acetoin reductase, become activated, thus diacetyl is transformed into acetoin and this in turn into 2,3-butanediol<sup>12</sup>.

#### EFFECT OF MICROBIAL GROUPS, NUTRITIONAL AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON DIACETYL BIOSYNTHESIS.

The path of diacetyl metabolism is set in a very sensitive way to the prevailing fermentation conditions, however, not all those affecting growth have been evaluated as to their role in flavor production. The most important factors are discussed below.

**Strains:** Lactic bacteria have different capabilities for diacetyl formation, *Leuconostoc cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* form the highest levels of diacetyl in dairy products. Other important species in diacetyl production are *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (formerly *L. bulgaricus*), *L. helveticus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (formerly *S. thermophilus*) and some strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*<sup>25,28,34,36,46</sup> (Table 1)

In the malolactic fermentation of wines, strains producing diacetyl are *Leuconostoc oenos*, *L. mesenteroides*, *L. cremoris*, *L. dextranicum*, *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus buchnerii*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. brevis* and *L. hilgardii*<sup>12, 23</sup>

The accumulation of certain flavors may be improved through the inoculum ratio of the strains involved, although its concentration also influences diacetyl production. Diacetyl reductase activity is counterbalanced with high inoculum levels (3%), in the ghee production<sup>44</sup>. This effect is also observed when milk is inoculated with a concentrated lyophilized starter culture, diacetyl reaching up to 8 to 8.4 mg.Kg<sup>-1</sup> in only two hours<sup>34</sup>.

The presence of starter strains of fast acid production favors activity of *Leuconostoc cremoris* in mixed cultures, since this increases growth rate as well as diacetyl yield<sup>34</sup>.

**Substrate chemical nature:** The metabolic pathway for diacetyl formation may start from citrate (Fig. 1), therefore a high concentration could divert the metabolism towards diacetyl biosynthesis. Milk

contains 0.15 to 0.18 % citrate and it is recommended to increase its concentration up to 0.30 to 0.38 % since it has been found that under these conditions lactic bacteria form up to 300 % more diacetyl<sup>5,20,34</sup>.

Fruit musts need not added citrate because their natural content is high. In these cases, it is recommended to use musts with low citrate content or to use low activity strains to avoid excessive diacetyl formation during malolactic fermentation<sup>29</sup>.

Cometabolism of citrate and glucose results in an enhanced growth, higher glucose consumption, inhibition of ethanol production through the heterolactic cycle, and more lactate production and flavoring metabolites from pyruvate in *Leuconostoc* spp. strains<sup>10</sup>. In contrast, *Lactococcus lactis* in anaerobic culture with excess glucose produced lactate without forming acetoin or diacetyl. However, in a chemostat with limiting glucose and moderate aeration production of both metabolites was clearly increased<sup>7</sup>.

A culture of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* in milk with a low inoculum, 0.1 % v/v, and a moderate CO<sub>2</sub> content as NaHCO<sub>3</sub>, stimulated the microbial growth as well as flavor formation. This is due not only to the buffer effect on pH and redox potential but also to the stimulation of synthesis or activity of the enzymes related to pyruvate metabolism. Microbial growth is also stimulated by the addition of oleic acid and its esters, such as tween 80 and 85, but this effect is nil if the inoculum is large<sup>32</sup>. An excess CO<sub>2</sub> is undesirable since diacetyl biosynthesis is impaired by oxygen replacement<sup>34</sup>.

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO, S. VALDES-MARTINEZ & J. SORIANO-SANTOS Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996

Some culture medium constituents have an effect on the metabolic pathways of bacteria. For instance, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* and *Leuconostoc lactis* use the acetolactate pathway for acetoin and diacetyl biosynthesis when they are deficient in lipoic acid (Fig. 1)<sup>9,24</sup>. Addition of acetaldehyde, lactate and ethanol in concentrations up to 30 mM do not affect the activity of acetolactate synthetase, which is necessary in the metabolic route<sup>9</sup>. Nevertheless, in these organisms there is an alternate path which requires low amounts of acetate and lipoic acid to form the intermediary acetyl-CoA, which in turn is linked to activated acetaldehyde to form diacetyl<sup>34</sup>.

In wine, ions  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  enhance diacetyl and acetoin production via citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactosum*. Whereas ions  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$  and the organic compounds L-cystine and acetaldehyde are inhibitors. Besides,  $Mg^{2+}$  ions are involved in the protection of *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus plantarum* against the toxic effect of oxygen improving the yield of acetoin<sup>45</sup>. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, can form diacetyl anaerobically in the absence of citrate if the medium Man Rogosa Sharpe (MRS) is supplemented with  $Cu^{2+}$  ions or hemin<sup>24</sup>.

**Redox potential and oxygen:** Diacetyl formation is favored by aeration, since raising the redox potential there is an increase of acetolactate synthetase activity 2 to 2.5 fold. Under reducing conditions, aside the inhibition of the enzyme, the product is transformed by reductases into odorless products, 2,3-butanediol and acetoin<sup>7,34,36</sup>. Moderate aeration (1 vvm

with 25 % air), inhibits pyruvate-formate-lyase, in favor of diacetyl and acetoin biosynthesis without impairing microbial growth<sup>7</sup>. For these reasons it is recommended that the so-called milk-butter fermentation should be carried out under aerobic conditions and air saturated before storage to prevent flavor losses<sup>22,34</sup>. Prolonged maturation of cheddar cheese diminishes diacetyl content because the protein degradation releases sulfhydryl-containing compounds which lower the redox potential to values of  $E_h = -200$  mV<sup>18</sup>.

**pH:** In milk, *Leuconostoc* species produce only acetoin and diacetyl at low values of pH, optimum between 3.8 and 4.4<sup>34</sup>. At this pH the route for citrate utilization is preferred because the intracellular pH diminishes gradually in response to external pH decrease. pH changes influence the activity of intracellular enzymes<sup>8,9</sup>. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* does not require so low a pH, since its activity is higher at pH 5.2<sup>25</sup>. By continuous dialysis, the best production is obtained at pH 5.4<sup>24</sup>. Optimum pH of the main enzymes citrate lyase, acetolactate synthetase, diacetyl reductase and acetoin reductase are 6.0, 5.5, y 5.7, respectively<sup>40</sup>.

During malolactic fermentation of wine, the transformation of citrate to diacetyl or acetoin is carried out in a range of pH from 2 to 6, the optimum for *Leuconostoc mesenteroides* is between 3.5 and 3.8<sup>11</sup>. Although cell free extracts of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactosum*, showed that citrate lyase activity was in the range of pH 4 to 8 with an optimum at 6<sup>45</sup>.

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOSOSIO, S. VALDEZ-MARTINEZ & J. SORIANO-SANTOS Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996.

TABLE 1  
Principal microorganisms producers of diacetyl

| Microorganism   | Substrate                | Reference  |
|---|--------------------------|------------|
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> | milk                     | 1, 27, 28  |
|   | buttermilk, fresh cheese | 36, 37     |
|   | ghee                     | 48         |
|   | soy                      | 42         |
|   | complex medium           | 8          |
|   | modified MRS medium      | 24         |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                              | complex medium           | 7          |
|   | modified MRS medium      | 6          |
| <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>                  | yoghurt                  | 30, 46     |
| <i>Leuconostoc cremoris</i>   | milk                     | 27, 34, 35 |
|   | fresh cheese             | 36, 37     |
|   | buttermilk               | 19, 36, 37 |
|   | wines                    | 12, 34, 35 |
|   | modified MRS medium      | 43         |
| <i>Leuconostoc oenos</i>  | wines                    | 13, 45     |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>  | wines                    | 12         |
|   | dhokla (cereal-milk)     | 22         |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>lactosum</i>                     | wines                    | 45         |
| <i>Leuconostoc dextranicum</i> subsp. <i>vinarium</i>                       | wines                    | 45         |
| <i>Leuconostoc dextranicum</i>  | milk                     | 27, 34, 35 |
| <i>Leuconostoc infrequens</i>   | wines                    | 45         |
| <i>Leuconostoc lactis</i>   | modified MRS medium      | 9          |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>                   | yoghurt                  | 30, 46     |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>  | wines                    | 12         |
|   | modified MRS medium      | 43         |
| <i>Lactobacillus hilgardii</i>  | wines                    | 12, 45     |
| <i>Lactobacillus buchneri</i>   | wines                    | 12         |
|   | modified MRS medium      | 43         |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>  | dhokla (cereal-milk)     | 22         |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>  | wines                    | 12, 45     |
| <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>                          | cheese, soy              | 21         |
| <i>Lactobacillus brevis</i>   | wines                    | 12, 45     |
|   | modified MRS medium      | 43         |
| <i>Pediococcus cerevisiae</i>   | wines                    | 12, 43     |

ESCAMILLA-HURTADO, M.L., A. TOMASINI-CAMPOCOSIO, S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996.

**Temperature:** This variable does not favor equally flavor production and acidification. For instance, in ghee the optimum temperature for growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is 30 °C whereas for diacetyl production it is 22 °C<sup>48</sup>. The temperature for the production of this compound during milk fermentation by mesophilic organisms is between 18 and 24 °C, but *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produce larger amounts at higher temperatures, 40 to 42°C<sup>18,34,39,46</sup>.

**Effect of  $a_w$ :** Studies carried out with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* grown in milk have shown a close relationship between  $a_w$  decrease

and microbial growth rate in a range of 0.98 to 0.87. Lower values may impair the active transport or energy production systems at the plasma membrane level, which are related with the flavor production<sup>3</sup>. Microorganisms better suited to low  $a_w$ , in a natural way, such as malolactic bacteria of wine<sup>12,45</sup> and cider<sup>33</sup>, or *Pediococcus halophilus* in soy sauce<sup>23</sup>, show a high metabolic activity even at very low  $a_w$  values.

#### CONCLUSIONS

The metabolic pathways for diacetyl biosynthesis are well known, both in wine or milk substrates. The environmental and nutritional factors affecting this activity are also known. This is an

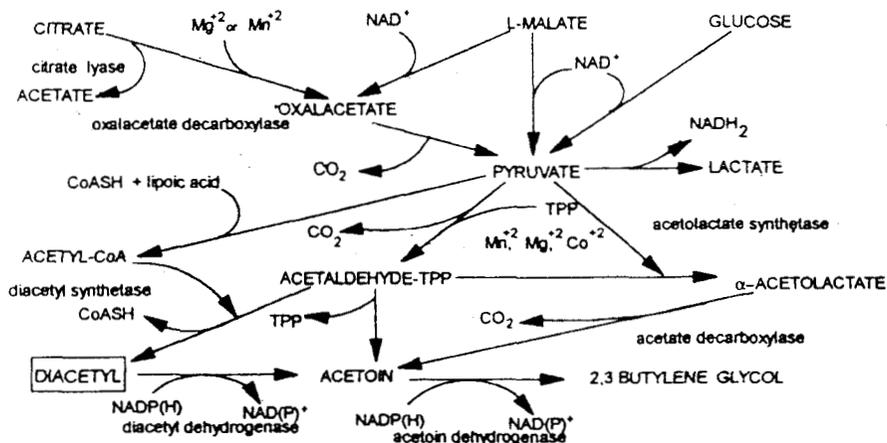


Figure 1. Metabolic routes for diacetyl production<sup>8,9,10,17,34,36,45</sup>

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO, S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996.

advantageous situation since it permits to actually direct the biosynthesis of diacetyl as well as the accompanying metabolites in lactic fermentations which will reduce costs and increase efficiency of the production processes of butter-like flavors. It is possible then, to offer to the food industry natural flavorings at low costs which will benefit the consumers who will get foods without artificial additives in them.

#### REFERENCES

1. BABU, K.S.; R.S. SINGH & H. CHANDER. 1989. Effect of antibiotic resistance on the flavor profile of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 56:155-157.
2. BASSET, F. 1990. Innovation alimentaire. Le quarté gagnant des aromacien. *Informations Chimie.* 320:176-180.
3. BASSET, N.; N. COCHET & J.M. LEBEAULT. 1993. Influence of water activity on *Streptococcus diacetylactis* metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:399-401.
4. BLAKE, A. 1990. The flavour industry in Europe-trends toward 1992. *Food Australia.* 42:558-560.
5. BOTAZZI, V. & M. VESCOVO. 1969. Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 23:84.
6. CACHON, R. & C. DUVIES. 1993. Kinetics of lactate fermentation and citrate bioconversion by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch culture. *J. Appl. Bacteriol.* 75:387-392.
7. COGAN, J.F.; D. WALSH & S. CONDON. 1989. Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 66:77-84.
8. COGAN, T.M. 1981. Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *J. Dairy Res.* 48:489-495.
9. COGAN, T.M.; R.J. GERALD & S. DOONAN. 1984. Acetolactate synthetase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. *J. Dairy Res.* 51:597-604.
10. COGAN, T.M. 1987. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63:551-558.
11. COX, J.D. & T. HENICK-KLING. 1990. A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:215-218.
12. DAVIS, C.R.; D. WIBOWO, R. ESCHENBRUCH, T.H. LEE & G.H. FLEET. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:290-301.
13. DAVIS, C.R.; D.J. WIBOWO, T.H. LEE & G.H. FLEET. 1986. Growth and metabolism of lactic bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:539-545.
14. DZIEZAK, J.D. (ed.). 1986. Special Report. Biotechnology and flavor development. *Food Technol.* 39:108-129.
15. ESCAMILLA-HURTADO, M.L. & E. MOZQUEDA-GONZALEZ. 1992. Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnol. Aliment. (Méx.)* 27:37-41.
16. ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; B. PEREZ, P. OLGUIN, R. ARTEAGA & O. GONZALEZ. 1992. Desarrollo de un alimento fermentado de maíz y su estudio de pre-factibilidad. *Mem. III Conferencia internacional sobre ciencia y tecnología de los alimentos.* La Habana, Cuba. II:11.40-11.42.
17. FURIA, T.E. & N. BELLACA. 1975. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients.* 2nd. Ed. 2. C.R.C. Press. Cleveland, Ohio, U.S.A.
18. GREEN, M.L. & D.J. MANNING. 1982. Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.* 49:737-748.
19. HAMMER, B.W. & F.G. BABEL. 1943. Bacteriology of butter cultures: A review. *J. Dairy Sci.* 26:83-168.
20. HARVEY, R.J. & E.B. COLLINS. 1963. Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bacteriol.* 86:1301.
21. HOFMAN, C.J. & W.E. MARSHALL. 1985. Lactic fermentation of ground soybean for use in imitation cream cheese products. *J. Food Sci.* 50:325-329.
22. JOSHI, N.; S.H. GODBOLE & P. KANEKAR. 1989. Microbial and biochemical changes during Dhokla fermentation with special reference to flavour compounds. *J. Food. Sci. Technol.* 26:113-115.
23. KANBE, C. & K. UCHIDA. 1987. Citrate metabolism by *Pediococcus halophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1257-1262.
24. KANEKO, T.; M. TAKAHASHI & H. SUZUKI. 1990. Acetoin fermentation by citrate positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or Cu<sup>2+</sup>. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2644-2649.
25. KEENAN, T.W.; R.C. LINDSAY; M.E. MORGAN & E.A. DAV. 1966. Acetaldehyde production by single-strain lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.* 49:10-14.
26. KEMPLER, G.M. & L.L. MCKAY. 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* spp. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 64:1527-1539.
27. KEMPLER, G.M. 1983. Production of flavor compounds by microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 29:42-45.
28. KLAVER, F.A.M.; F. KINGMA, J.M.K. THAMER & A.H. WEERKAMP. 1992. Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermenter: buttermilk. *Neth. Milk Dairy J.* 46:19-30.

ESCAMILLA-HURTADO, M.L.; A. TOMASINI-CAMPOCOSIO; S. VALDÉS-MARTÍNEZ & J. SORIANO-SANTOS. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:129-137, 1996.

29. KUNKEE, R.E. 1967. Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol. Viticult.* 18:71-77.
30. LAYE, Y.; D. KARLESKIND & C.V. MORR. 1993. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. *J. Food Sci.* 58:991-1000.
31. LONVAUD, M.; A. LONVAUD-FUNEL & P. RIBERAUD-GAYON. 1977. Le mecanisme de la fermentation malolactique des vins. *Connaissance vigne et vin.* 11:734-91.
32. LOUALECHE, H.; P. BRACQUART, F. SAULNIER; M. DESMAZEAUD & G. LINDEN. 1993. Carbon dioxide effect on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 76:3683-3689.
33. MANGAS, J.J.; J. MORENO; C. CABRANES; E. DAPENA & D. BLANCO. 1993. Contribución al estudio de la sidra parcialmente dulce. *Alimentaria.* 243:85-89.
34. MARGALITH, P.Z. 1981. *Flavor microbiology*. pp. 37-60, Charles Thomas Pub. Springfield, Ill. U.S.A.
35. MARGALITH, P.Z. & Y. SCHWARTZ. 1970. Flavor and microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 12:35-88.
36. MARSHALL, V.M. 1987. Fermented milk and their future trends. I. Microbiological aspects. *J. Dairy Res.* 54:559-574.
37. MARSHALL, V.M. 1993. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J. Soc. Dairy Tech.* 46:49-93.
38. McCORD, J.D. & D.D.Y. RYU. 1985. Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:214-218.
39. MCGREGOR, J.U. & C.H. WHITE. 1987. Effect of sweeteners on major volatile compounds and flavor of yoghurt. *J. Dairy Sci.* 70:1828-1834.
40. MELLERCK, D. & T. COGAN. 1981. Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 48:497-502.
41. MERORY, J. 1968. *Food flavorings. Composition, manufacture and use*. The AVI Pub. Co. Inc. Westport, Conn., U.S.A.
42. PATEL, A.A.; W.W. WAGHMARE & S.K. GUPTA. 1980. Lactic fermentation of soymilk. A review. *Process Biochem.* Oct./Nov:9-13.
43. PULONE, G.J.; R.E. KUNKEE & A.D. WEBB. 1966. Chemical characterization of wines fermented with various malo-lactic bacteria. *Appl. Microbiol.* 14:608-615.
44. SANOFI BIO-INDUSTRIES, INC.-DIV. CULTURES & ENZYMES. 1994. Catálogo de ingredientes lácteos enzimáticamente modificados. Waukesha, Wi. U.S.A.
45. SHIMAZU, Y.; M. UEHARA & M. WATANABE. 1985. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin, and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 49:2147-2157.
46. TAMME, A.Y. & H.C. DEETH. 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food. Prot.* 43:939-977.
47. WIBOWO, D.; R. ESCHENBRUCH; C.R. DAVIS; G.H. FLEET & T.H. LEE. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:302-313.
48. YADAV, J. & A. SRINIVASAN. 1985. Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. on the flavour of ghee (clarified butterfat). *J. Dairy. Res.* 52:547-553.

# de Alimentos <sup>MR</sup>

# Tecnología



Organo Oficial de la  
Asociación Nacional de  
Tecnólogos en Alimentos  
de México, A.C.

Consejo Editorial 1996

Director Técnico Revista  
Sara Valdés

Director Honorario  
Hector Bourges

Consejeros  
Ramón Arana  
Gloria Dávila  
Lourdes Escamilla  
Amanda Galves  
Humberto Hernández  
Gustavo Gutierrez  
Rafael C. Marfil  
Ernesto Moreno  
Sara Valdés  
Pedro Valle

#### Corresponsales

Angel Torreblanca (Mérida)  
José Gerardo Montejano (Querétaro)  
Octavio Paredes López (Irapuato)  
Angélica Medina (Jalisco)  
Jorge A. Pino Alea (Cuba)

Eventos y Sociales  
Fernando Gallegos G.  
Manuel Tuñas Quiroga

Diseño Gráfico  
C.G. Lilia Ballesteros Hernández

• • • • •

#### Consejo Nacional 1996

Eduardo Molina Cortina  
Presidente

Alejandro Chávez Castilla  
Vice-Presidente

Marcos Baez  
Secretario

José Manuel Castellanos  
Tesorero

Rafael C. Marfil Rivera  
Consejero

# Tecnología

## de Alimentos

Vol. 31, No.2

### CONTENIDO

Editorial ..... 3

#### INVESTIGACION

Estudio en el Microscopio  
Electrónico de Barrido de Harinas  
Precocidas de Maíz ..... 5  
*González-Parada, Z. y Mosqueda, M.B.*

Efecto del Tratamiento Térmico Sobre el  
Contenido de Fitato de Leche de Soya,  
Harinas de Avena y concentrados  
Proteicos de Amarato ..... 11  
*K. Shairai, S. Revah-Moiseev, M. García Garibay*

Importancia del Diacetilo en los Aromas  
Producidos por Fermentación ..... 16  
*M.L. Escamilla-Hurtado; A. Tomasini-Campocoso;  
S.E. Valdés-Martínez y J. Soriano-Santos*

#### INDUSTRIA

Elaboración de Croquetas y Albóndigas a  
Base de una Pasta de Pescado  
para Consumo Humano ..... 23  
*P. Choulea K.; Ma. E. Pérez Azuela; E. Decamp, J.  
Montiel Montoya y P. Valle Vega*

Micología en Alimentos. Adecuación y  
Medios de Cultivo ..... 32  
*Alvarado A. Venegas, E.*

El Uso de Acido Fumárico en Tortillas  
de Harinas de Trigo ..... 33  
*Sortwell D.*

Próximos Eventos ..... 33

Evento Internacional ..... 35

Eventos ..... 38

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. Publicación bimestral. Órgano Oficial de la Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México, A.C. Toda correspondencia y solicitud de suscripciones dirigirla a: Mar del Norte No. 5, Col. San Alvaro, México, D.F. 02090, Tels. 386-10-83, 386-13-68. Telfax 386-19-52. Suscripciones para la República Mexicana: 1 año (6 números) \$150.00 M.N.; para el extranjero, correo ordinario 1 año 20.00 Dls. Numeros sueltos: \$25.00 M.N. Solicitamos corresponsales. Se aceptan colaboraciones relacionadas al ramo de esta revista. Todo envío de fondos deberá hacerse en cheque o giro a nombre de esta Asociación. Autorizada como correspondencia de 2a. clase por la Dirección General de Correos con fecha 15 de abril de 1971 y Número de Control 428. Las opiniones expresadas en los trabajos publicados son responsabilidad personal del autor, y de ninguna manera deben considerarse como opiniones de la Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México, A.C. ni de la empresa dependencia o institución en donde presta sus servicios profesionales el autor.

## Importancia del Diacetilo en los Aromas Producidos por Fermentación Láctica

### *Relevance of Diacetyl in Flavor Produced by Lactic-Fermentation*

M.L. Escamila-Hurtado\*; A. Tomasini-Campocoso\*;  
S.E. Valdés-Martínez\*\* y J. Soriano-Santos\*.

\* Depto. Biotecnología, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa.

A.P. 55-535, C.P. 09340. Iztapalapa, D.F. México.

\*\* Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad  
Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Edo. México  
México.

#### Resumen

La demanda de alimentos naturales por los consumidores ha generado un gran interés de los sectores académico e industrial, en los aromas y sabores obtenidos por procesos biotecnológicos. La presente es una revisión actualizada sobre la importancia del diacetilo como principal componente del aroma tipo mantequilla que se forma durante la fermentación láctica de los alimentos. Se discute también la función, ventajas y desventajas de este compuesto en los productos lácteos, las bebidas alcohólicas, los vegetales ensilados y los substratos amiláceos. Se revisa brevemente la legislación relacionada con la aplicación de ingredientes saborizantes naturales; y en la última sección, se menciona la situación del diacetilo usado como aditivo por la industria alimentaria mexicana.

Palabras claves: Aroma, diacetilo, fermentación láctica, legislación, mexicana

#### Summary

(The demand of natural foods from consumer has generated a great interest related to the flavors and aromas produced by biotechnological processes from the academic and industrial sectors. The present review deals with the importance of diacetyl, as the main component of the butter aroma, a type that is generated during the lactic-fermentation of food products. The function, advantages and disadvantages of this compound in milk products, alcoholic beverages, silage and starchy substrates are also discussed. Legislation is revised briefly related with the application of natural flavoring ingredients and in the last section, the situation of diacetyl used as an additive for the Mexican Food Industry is mentioned.)

(Key words: Aroma, diacetyl, lactic-fermentation, legislation, Mexican.)

#### Introducción

El creciente interés que existe de consumir alimentos naturales, ha originado una demanda de aromatizantes preparados por procedimientos alternativos a la síntesis química, como son los formados durante los procesos biotecnológicos. Entre éstos destaca la nota aromática a mantequilla, cuyo componente más importantes es sin duda el diacetilo o 2,3-butanodiona (CH<sub>3</sub>COCOCH<sub>3</sub>). El aroma dominante de este compuesto se complementa con una mezcla compleja

de otros como son: la acetoina, el 2,3-butanodiol, la acetona, los ácidos grasos volátiles y algunos más en concentraciones traza, que en conjunto se percibe como el aroma a mantequilla natural.<sup>7,10,45</sup>

Las formulaciones artificiales con aroma tipo mantequilla eran hasta hace poco las únicas disponibles en el mercado; sin embargo, no es fácil obtener sintéticamente un perfil que se asemeje al natural, pues los costos suelen limitar el número de compuestos químicos utilizados, dando origen a productos con detectable aroma artificial.<sup>16,25,28,51,59</sup>

Existen grupos multidisciplinarios que se realizan grandes esfuerzos para que los "aromatizantes de la nueva generación" tengan un costo atractivo, al incluir en la misma presentación, además de las funciones de aromatización natural, las de emulsificación, humectación, estabilización, extensión, etc.<sup>16,31,45,50</sup>

En este trabajo se revisa la importancia del diacetilo como componente en los perfiles aromáticos que se desarrollan durante la fermentación láctica de diversos alimentos.

También se revisan algunos aspectos legales, relacionados con la producción y aplicación del diacetilo como aditivo alimentario y se mencionan algunos datos sobre la situación actual de la industria mexicana relacionada con la aplicación de este compuesto.

#### Función del diacetilo formado en diversos alimentos por fermentación

**Productos lácteos:** En la fermentación de la leche destinada a la elaboración de mantequilla, quesos frescos, queso cottage y leche-mantequilla se emplean las mismas mezclas de iniciadores mesofílicos para acidificar y desarrollar la nota aromática tipo mantequilla.<sup>31</sup> El diacetilo formado con un cultivo iniciador puede alcanzar un nivel entre 2.7-3.8 mg l<sup>-1</sup> en la leche y esta concentración puede elevarse hasta 18 mg l<sup>-1</sup>, cuando se modifica el proceso tecnológico o se aplica una cepa hiperproductora,<sup>23,28,61,64</sup> preferentemente, resistente a los antibióticos.<sup>1</sup> La concentración de este aromatizante puede cambiar durante las operaciones posteriores, alcanzando en el queso cheddar niveles hasta de 20 mg Kg<sup>-1</sup>,<sup>8</sup> mientras que en el cottage y en la mantequilla el rango de concentración de 2-2.5 mg Kg<sup>-1</sup>, es considerado suficiente para los productos de buena calidad.<sup>13,28,35,64</sup> En forma similar, el ghee que es un producto tradicional hindú preparado por maduración de grasa de leche clarificada, presenta concentraciones de diacetilo entre 1.5-2.9 mg Kg<sup>-1</sup>.<sup>65</sup> En el yoghurt natural o edulcorado, este compuesto es el segundo en importancia en el aroma, encontrándose normalmente entre 0.5-1.5 mg Kg<sup>-1</sup>,<sup>15,34,64</sup> aunque algunas veces llega hasta 13 mg Kg<sup>-1</sup>, dando una sensación pungente y en consecuencia, sensorialmente inaceptable.<sup>28,60</sup> La concentración de diacetilo que presentan las leches-mantequilla comerciales es muy variable, pudiendo fluctuar entre 0.56-5.1 mg l<sup>-1</sup>.<sup>61,64</sup>

Existe en el mercado algunos concentrados con aroma a mantequilla, a crema o a queso aprobados por F.D.A., los cuales son elaborados por fermentación de sustratos lácteos con formación de diacetilo. Generalmente los volátiles de estos cultivos son extra-

dos por destilación al vapor y en ocasiones, la nota aromática se modifica con ensayos enzimáticos antes de concentrarlos. Estos extractos se refuerzan frecuentemente con sustancias artificiales y logran un efecto global mas fiel que los aromatizantes sintéticos<sup>21,47,48,52</sup>

El diacetilo tiene además de su olor suigéneris, la capacidad de impartir una sensación de cremosidad y delicadeza en productos como yoghurt, helados, leches malteadas y otras bebidas. Esta función es especialmente importante en los alimentos bajos en grasa, en donde los aromas se intensifican frecuentemente a niveles indeseables por tener una polaridad mas elevada que la de los sistemas originales, lo que ocasiona que los componentes oleosolubles sean mas volátiles. En estos alimentos, el diacetilo contribuye en la resolución del problema al dar una sensación olfativa y gustativa de armonía, englobado y suavizando a otras notas aromáticas.<sup>14,16</sup> Además, siendo el diacetilo un compuesto polar no se desestabiliza tanto, presentando en alimentos con 2% de grasa, una volatilidad apenas del doble que la observada en otros productos con 20% de grasa.<sup>57</sup> Un avance tecnológico que permite integrar mas eficientemente los aromas considerados "delicados" como el mencionado, tanto a alimentos grasos o acuosos, es incluyéndolos en microcápsulas a base de almidones cerosos modificados.<sup>17</sup>

La producción de diacetilo por las bacterias lácticas se ve acompañada de otros compuestos, entre ellos destaca el acetaldehído, que en el yoghurt es considerado como el aromatizante principal y se presenta en un rango de concentración entre 1-45 mg Kh<sup>-1</sup>, dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo.<sup>1,32,60</sup> El acetaldehído imparte un agradable aroma a avellana y un sabor fresco, que sensorialmente es mas aceptable cuando se encuentra en una concentración entre 10-41 mg Kg<sup>-1</sup>.<sup>15,60</sup> y una relación de acetaldehído: diacetilo entre 1:1 a 1.45:1,<sup>24,60</sup> aunque en algunos productos comerciales puede ser hasta de 33:1, confiriendo una sensación gustativa irritante y herbácea.<sup>26,60</sup>

En el yoghurt se han determinado mas de 30 compuestos volátiles en el yoghurt con menor impacto aromático. Algunos son biosintetizados por las bacterias lácticas, como la acetona (0.2-5.2 mg Kg<sup>-1</sup>), la 2-butanona y los ácidos orgánicos de cadena corta (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); otros compuestos se forman por degradación térmica de compuestos orgánicos diversos.<sup>15,24,60</sup> Los compuestos más relacionados por compartir las mismas rutas metabólicas en las bacterias y el 2,3-butanodiol y aunque se forman en cantidades superiores al primero (2-6.5 veces), son inodoros e insípidos.<sup>30,60</sup>

En el cultivo de leche destinada a producir mantequilla la concentración de acetaldehído se presenta

en un rango de 0.27-0.45 mg l<sup>-1</sup>, y la mejor relación diacetilo: acetaldehído en este cultivo fluctúa entre 3:1 y 8:1.<sup>29,61</sup> Durante las primeras 6 h. se forman poco acetaldehído; sin embargo, en los cultivos que se prolongan inapropiadamente hasta 22-24 h, su concentración puede llegar a ser de 6 a 10 veces la del diacetilo.<sup>20,29</sup>

Del queso cheddar se han identificado actualmente mas de 200 compuestos volátiles, pero los que definen su aroma característico de manera significativa, son solamente tres: el ácido butírico, el metional y el diacetilo.<sup>8</sup>

Los compuestos que contribuyen a dar el aroma de maduración al ghee (grasa láctea clarificada de origen hindú) que sensorialmente son mas deseables, se forman en las primeras 18 h de fermentación; éstos son: el diacetilo (2.9 mg Kg<sup>-1</sup>), el acetaldehído (1.6 mg Kg<sup>-1</sup>) y los ácidos grasos volátiles (1.3 mg Kg<sup>-1</sup>).<sup>45</sup>

La necesidad de controlar los perfiles aromáticos formados durante las fermentaciones de los productos lácteos, ha motivado que se inviertan muchos recursos en el estudio de las bacterias lácticas; algunos aspectos relacionados con los factores que afectan la formación del diacetilo y con las rutas metabólicas de su biosíntesis han sido discutidos por varios autores.<sup>22,25,30,28</sup>

**Bebidas alcohólicas:** La sensación por el diacetilo, biosintetizado al fermentar substratos de origen vegetal, tiene diferente aceptabilidad. Los umbrales de detección olfativa de este compuesto varían dependiendo de las bebidas alcohólicas y de la sensibilidad de los evaluadores, siendo entre 5 y 50 µg l<sup>-1</sup> en la cerveza,<sup>3,54</sup> de 20 µg l<sup>-1</sup> en whisky sintético y de 50 µg l<sup>-1</sup> en vino sintético; pero con el efecto sinérgico que da el acetato de etilo al añadirlo al último sistema, el umbral puede disminuir hasta 12 µg l<sup>-1</sup>.<sup>54</sup>

El contenido de diacetilo es en promedio, menor en las cervezas tipo lager (20-80 µg l<sup>-1</sup>) que en las de tipo ale y stout (40-580 µg l<sup>-1</sup>). En bajas concentraciones este compuesto contribuye al aroma, pero a partir de 200-250 µg l<sup>-1</sup> en cerveza lager o pilsner, o bien, 450 µ l<sup>-1</sup> en cervezas americanas, el olor a grasa láctea que desarrolla ya es inaceptable. Este problema puede atribuirse a la actividad de las bacterias lácticas y/o de levaduras aerobias y cuando se presenta, el industrial se ve obligado a adicionar la enzima diacetil-reductasa, incrementando los costos de producción.<sup>3,29,49</sup>

El diacetilo formado durante la fermentación maloláctica en el vino linto alcanza normalmente concentraciones entre 1-4 mg l<sup>-1</sup>, a las cuales se integra y armoniza con el etanol y con otros componentes como los ésteres de acetato, el succinato y el lactato de etilo, para aumentar la complejidad del aroma. El conjunto constituye el apreciado "bouquet de maduración biológica"

que eleva la calidad sensorial del producto.<sup>25,42,55,63</sup> Pero si el diacetilo alcanza concentraciones mayores de 4 mg l<sup>-1</sup>, el olor se vuelve inaceptable.<sup>9,27</sup> Cuando la fermentación alcohólica del vino se realiza con un control deficiente, las levaduras salvajes pueden formar diacetilo y acetoina; en estos casos no es recomendable madurar biológica o químicamente el producto, pues la concentración aditiva de los compuestos mencionados podría llegar hasta 37 mg l<sup>-1</sup>, que es un nivel sensorialmente indeseable.<sup>56</sup>

**Ensilados vegetales:** La velocidad de fermentación de la col agria tiene efecto en las características sensoriales del producto; siendo el proceso de encurtido lento el más apropiado, formando ácidos láctico, acético y succínico como productos principales y desarrollando aromas suaves como el que imparte el diacetilo, el cual se detecta en los primeros días. El proceso rápido por otro lado, favorece la acumulación de ácidos grasos que son los responsables de los olores desagradables a "zapatera" o a "queso"; en estos casos, el contenido de los volátiles de cadena corta (C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>) pueden llegar a una concentración de 990 mg Kg<sup>-1</sup> y el del ácido palmítico hasta 220 mg Kg<sup>-1</sup>, en base seca. En la fermentación rápida de pepinillos se acumula aproximadamente el doble de estos compuestos.<sup>28</sup>

Por otro lado, durante el encurtido de aceitunas se forma una gran cantidad de compuestos aromatizantes y sin embargo, no se ha encontrado diacetilo, a pesar de que el consumo de citrato (precursor del diacetilo en otros alimentos), sí se presenta.<sup>36,37</sup>

El té negro que se consume en todo el mundo es un producto ensilado, el cual desarrolla una gama muy grande de compuestos volátiles (mas de 300), entre los que se ha detectado al diacetilo.<sup>66</sup>

**Substratos amiláceos:** Entre los 150 compuestos volátiles que se han identificado en el aroma del pan, el diacetilo está presente aunque sin resaltar.<sup>62</sup> Por otro lado, si se desea impartir un aroma tipo mantequilla a los productos de panificación, la concentración de diacetilo necesaria en el producto terminado es generalmente muy baja (2.5 mg/Kg<sup>-1</sup>); pero debido a que las pérdidas durante el horneado pueden alcanzar hasta 96%, este compuesto debe estar presente en exceso en las formulaciones iniciales.<sup>46</sup>

La mayoría de las investigaciones sobre la fermentación láctica de los substratos amiláceos se han orientado al estudio de la acidificación, al valor nutritivo y a la actividad amilolítica de las cepas; cuando se mencionan aspectos relacionados con el aroma, generalmente son datos subjetivos.<sup>25,29</sup> en el ogi nigeriano, que es un ensilado de maíz, se ha detectado un aroma tipo yoghurt, <sup>24</sup> sin hacer mención al tipo de

compuestos aromatizantes, mientras que el gari que se elabora de yuca, se obtiene mas bien una nota frutal, aparentemente debido a la formación de los ácidos propiónico y acético, además de otros compuestos como aldehídos y cetonas.<sup>39</sup> El dhokla es un alimento tradicional hindú que se elabora por fermentación láctica de una pasta de cereales y leche, adquiriendo un aroma tipo mantequilla por la formación de diacetilo (5.2 mg Kg<sup>-1</sup>) y de ácidos grasos volátiles.<sup>19</sup>

Durante la fermentación láctica que se establece naturalmente en algunos alimentos tradicionales mexicanos como el pozol, que es una masa de maíz nixtamalizada y fermentada,<sup>11</sup> y en el atole agrio del grupo étnico tzotzil, que se elabora a partir de maíz sumergido en agua durante varios días,<sup>12</sup> se han detectado aromas tipo lácteos por pruebas sensoriales, predominando las notas butírica y a mantequilla.<sup>41</sup>

Algunos cultivos de soya que imitaban el proceso del yoghurt, han sido inoculados con exudados de ensilados de maíz, yuca y calabaza y aunque se desarrollaron aromas agradables tipo lácteo en todos los productos, no se detectó el olor tipo mantequilla en ninguno de ellos.<sup>38</sup> Sin embargo, este aroma pudo inducirse en la leche de soya cuando se reforzó con ácido cítrico al 0.15%, fermentando con cepas puras productoras de diacetilo.<sup>42</sup>

En el cacao y productos derivados, se han identificado aproximadamente 500 sustancias volátiles, muchas de ellas aromatizantes. La fracción de los aldehídos y cetonas (incluyendo al diacetilo) que se forma al final de la fermentación mixta, contribuye con una nota frutal y floral, convirtiéndose en un grupo sensorial importante para este producto; es en esta etapa cuando se han detectado las mayores cuentas de bacterias lácticas.<sup>34</sup>

#### Aspectos legales

El Ministerio de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos de América clasifica a los aromas en tres grandes grupos: en primer lugar están los "sintéticos", que a su vez se subdivide en los que son "idénticos a compuestos naturales" pero sintetizados químicamente, y los "artificiales", que no existen en la naturaleza; el segundo grupo lo constituyen los "naturales", que son los obtenidos de materiales vegetales o animales por procesos físicos, microbiológicos y/o enzimáticos apropiados y por último están los "reforzados", que son una mezcla de los dos anteriores.<sup>6</sup> Este Ministerio y la Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos (FEMA) incluyeron al diacetilo dentro de la lista de aditivos que se denominan Generalmente Reconocidos Como

Seguros (GRAS), habiendo sido registrado con el No. 2370. De esta manera, permiten su aplicación como aromatizante artificial a ciertos alimentos, en las siguientes concentraciones máximas: bebidas no alcohólicas, 2.5 mg l<sup>-1</sup>; helados y nieves, 5.9 mg Kg<sup>-1</sup>; dulces, 21 mg Kg<sup>-1</sup>; productos homeados, 44 mg Kg<sup>-1</sup>; gelatinas y pudines, 19 mg Kg<sup>-1</sup> y chicles, 35 mg Kg<sup>-1</sup>.<sup>13,39</sup>

Por su lado, el Consejo Directivo de la Comunidad Económica Europea emitió en 1988, instrucciones para unificar y legalizar el uso de aromatizantes y a partir de 1990 las normas emitidas se hicieron obligatorias en todos los países asociados.<sup>5</sup> De acuerdo a esta legislación, el diacetilo puro entra en la clasificación de "sustancia aromatizante" ya sea que se hubiera obtenido por síntesis química, o por un proceso microbiológico. Por otro lado, esta legislación indica que si los aromatizantes se encuentran en extractos obtenidos de materiales naturales, o sin extraer, entonces se denominan a las mezclas "preparaciones aromatizantes".<sup>45</sup>

Con un criterio más amplio, las regulaciones que contempla el Codex Alimentarius<sup>58</sup> se originan de un esfuerzo a nivel internacional, con el fin de unificar criterios acerca de la calidad deseable en los alimentos y sus procesos de elaboración. En la clasificación de aditivos alimentarios se incluyen a los aromas y sabores naturales, a las sustancias naturales e idénticas a las naturales con estas funciones y también a las artificiales; sin embargo, a ninguna de ellas se les ha asignado hasta el momento, un número en el Sistema Internacional de Numeración que maneja esta legislación. Aunque no se menciona específicamente al diacetilo, sí indica que los aromatizantes (naturales y artificiales) pueden añadirse al yoghurt, a los quesos y a productos tratados por procesos térmicos después de la fermentación, y su concentración estará autolimitada por sus propiedades sensoriales y otras consideradas como "Buenas Prácticas de Manufactura", a estos alimentos también se les puede añadir bacterias lácticas que desarrollen aromas.

La Secretaría de Salud de México<sup>53</sup> regula el uso de "saboreadores o aromatizantes", clasificándolos en 9 categorías. el diacetilo sintético puede entrar en varias de ellas basándose en su presentación al mercado mas que en su origen de obtención; aunque esta legislación no considera explícitamente a los saboreadores o aromatizantes elaborados por fermentación.

#### Aplicación del diacetilo en México

El mercado para los aromatizantes con notas tipo lácteo en México es notablemente importante pues al año, aproximadamente 2,000 Ton de alimentos procesador incluyen en su formulación a estos aditivos.

Las industrias del sector lácteo y las de productos de panificación son las que más utilizan los aromas a mantequilla en México y en menor proporción, las que elaboran productos de confitería y atoles. El diacetilo forma parte también de otros aromas, como los de queso, que son demandados principalmente por la industria láctea y la de botanas.

Las presentaciones artificiales con nota a mantequilla que se elabora en este país, son mezclas con 6 a 25 aromáticos (componentes básicos con aroma peculiar), aunque predominan los que contienen entre 16 a 18, dependiendo de la complejidad y fidelidad deseada. En estas mezclas, el componente principal es también el diacetilo, el cual se complementa con ácidos grasos volátiles, ácido láctico, ésteres y lactonas y se presentan comercialmente en forma líquida o en polvo. La dosificación recomendada de estos aromatizantes comerciales fluctúa entre 0.1 - 0.3% para los alimentos líquidos, mientras que a los sólidos se les añade hasta 4%, en promedio. De esta manera, el diacetilo se encuentra en una concentración entre 0.01 - 0.03%, del peso del alimento.

Las dosis fijas de aromatizantes las aplican solamente las industrias palmentarias pequeñas, ya que las medianas y grandes prefieren invertir en el desarrollo de perfiles más fieles y estables con ensayos particulares realizados por grupos multidisciplinarios, en los que se evalúa no solo la concentración, sino también aspectos relacionados con la selección del vehículo del aditivo, las modificaciones durante el proceso, la aceptabilidad y los costos.

El diacetilo no se produce en México<sup>28</sup> y por lo tanto, debe importarse con un costo unitario intermedio en relación al de otros aditivos artificiales. Sin embargo, como el nivel de dosificación suele ser muy pequeño, su aplicación no incrementa sensiblemente el costo del alimento.

Los gastos relacionados con la saborización artificial deben considerarse como un marco de referencia cuando se pretende sustituir los aditivos artificiales, por los derivados de procesos biotecnológico, ya que la alternativa debe resultar igual o más económica. En el mercado de México hay disponibilidad de productos biotecnológicos de importación que imparte una nota natural, como los extractos con aroma a mantequilla o queso, elaborados por procesos enzimáticos o microbianos. La concentración recomendada de estos aromatizantes en los alimentos, fluctúa entre 0.5 - 2%. Aunque en el caso de los productos lácteos fermentados, es más frecuente que la nota a mantequilla se desarrolle por la acción de iniciadores lácticos liofilizados, especialmente preparados para cada alimento.

Debe considerarse entonces, que actualmente son los países de tecnología avanzada, los que poseen los

recursos para desarrollar aromas con diacetilo utilizando procesos biotecnológicos de punta, de lo que se deriva que controlen su elaboración y comercialización en todo el mundo, generalmente a través de sus filiales.

### Conclusiones

1. El diacetilo formado durante la fermentación láctica imparte una nota aromática tipo mantequilla, la cual se complementa con las de otros metabolitos que en conjunto, constituyen un aroma "natural".
2. La presencia de diacetilo es deseable en los productos lácteos, hacia los que se han orientado los principales avances científicos y tecnológicos.
3. En la mayoría de los alimentos fermentados de origen vegetal; el diacetilo forma parte de notas aromáticas complejas aunque en este caso se encuentra en menor concentración.
4. La aplicación del diacetilo como aditivo alimentario está regulada por legislaciones internacionales, en donde se enfatizan según cada país, aspectos como la fuente, las dosis y las condiciones de uso.
5. Dentro de los aromáticos artificiales consumidos en México, el diacetilo es considerado uno de los más importantes pues su demanda es extensiva; sin embargo, se debiera desarrollar procesos biotecnológicos propios para la producción de aromas tipo mantequilla.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la invaluable información proporcionada por las siguientes personas e instituciones, en relación a la situación de la industria mexicana: Alarcón-García, G. de International Flavors and Fragrances-México, S.A. de C.V.; Covarrubias-Córdoba, S. de PRITIS Internacional-México; Duhne-Echeverría, J.; Escalante G., E. de Chr. Hansen de México, S.A. de C.V.; Lara-Sabido, J.O. de TECMA-Comercializadora, S.A. de C.V.; Medina, A. de Medina Sabores y Colorantes, S.A. de C.V.; Pascoe-Chalile, P. de S.B.I. de México, S.A. de C.V. México, D.F.; Valdéz-P., A.P. de MANE México, S.A. de C.V. y Valle-Vega, P. de Productos de Maíz, S.A. de C.V.

### Referencias

1. Babu, K.S., Singh, R.S. y Chander, H. 1989. Effect of antibiotic resistance on the flavour profile of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 56: 155-157.
2. Banigo, E.O.I. y Müller, H.G. 1972. Manufacture of ogi (a Nigerian fermented cereal porridge): comparative evaluation of corn, sorghum and millet. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 5(4): 217-221.

- 3 Barcelo, C., Gassiot, M. y Ferrer, M. 1978. Determination of diacetyl in beer by gas chromatography with flame-ionization detection. *J. Chromatogr.* 147:463-469.
- 4 Basset, F. 1990. Innovation alimentaire. Le quart gagnant des aromacien. *Informations Chimie.* 320:176-180.
- 5 Blake, A. 1990. The flavour industry in Europe-trends toward 1992. *Food Australia.* 42:558-560.
- 6 Brouard, B. 1992. L'olfaction: à l'aube d'une révolution. *Biofutur.* Feb.:18-20.
- 7 Cacchon, R. y Davies, C. 1993. Kinetics of lactate fermentation and citrate bioconversion by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch culture. *J. Appl. Bacteriol.* 75:387-392.
- 8 Dacremont, C. y Vickers, Z. 1994. Concept matching technique for assessing importance of volatile compounds for cheddar cheese aroma. *J. Food Sci.* 59(5):981-985.
- 9 Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. y FLeet, G.H. 1985. Practical implications of malolatic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(4):290-301.
- 10 Dziezak, J.D. (ed.). 1986. Special Report. Biotechnology and flavor development. *Food Technol.* 39(4):108-129.
- 11 Escamilla-Hurtado, M.L. y Mozzueda-González, E. 1992. Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*. 27:37-41.
- 12 Escamilla-Hurtado, Olguin-Lora, P. y Prado-Barragán, L.A. 1993. Fermentación láctica en el atole agrio del grupo étnico tzotzil. *Rev. Esp. Cien. Tec. Aliment.* 33(5):554-564.
- 13 Funa, T.E. y Bellaca, N. 1975. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 2nd. Ed. 2. C.R.C. Press. Cleveland, Ohio, U.S.A.
- 14 Giese, J. (ed.). 1994. Special report. Modern alchemy: use of flavors in food. *Food Technol.* 48(2):106-116.
- 15 Green, M.L. y Manning, D.J. 1982. Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.* 49:737-748.
- 16 Hatchwell, L.C. (ed.). 1994. Overcoming flavor challenges in low-fat frozen desserts. *Food Technol.* 48(2):98-102.
- 17 Hippleheuser, A. 1995. Aplicaciones de alimentos especializados en: A) Encapsulantes de grasas, aceites y sabores. Conferencia en EXPO TECNOLIMENTARIA 95. Asociación de Tecnólogos en Alimentos de México (ATAM), México. D.F. y Folleto informativo. American Maize Products Co. Indianapolis, Ind., U.S.A.
- 18 Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática (INEGI). Secretaría de Programación y Presupuesto. 1986. La industria química en México. Aguascalientes, Ags., México.
- 19 Joshi, N., Godbole, S.H. y Kanekar, P. 1989. Microbial and biochemical changes during Dhokla fermentation with special reference to flavour compounds. *J. Food Sci. Technol.* 26: 113-115.
- 20 Keenan, T.W., Lindsay, R.C., Morgan, M.E. y Day, E.A. 1966. Acetaldehyde production by single-strain lactic *Sterptococci*. *J. Dairy Sci.* 49: 10-14.
- 21 Kempler, G.M. 1983. Production of flavor compounds by microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 29: 42-45.
- 22 Kempler, G.M. y McKay, L.L. 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 64:1527-1539.
- 23 Klaver, F.A.M., Kingma, F., Timmer, J.M.K. y Weerkamp, A.H. 1992. Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermenter; buttermilk. *Neth. Milk Dairy J.* 46: 19-30.
- 24 Laye, I., Karleskind, D. y McClr., C.V. 1993. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. *J. Food Sci.* 58(5):991-995.
- 25 Lindsay, R.C. 1966. *Chemistry and physiology of flavors*. H.W., Schultz, E.A. Day y M. Libbey (eds.) 315 Av. Publ. Westport, Conn., U.S.A.
- 26 Lindsay, R.C., Day, E.A. y Sandine, W.E. 1965. Studies on the green flavor defect in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.* 48:863-869.
- 27 Lonvaud, M., Lonvaud-Funel, A. y Ribéraud-Gayon, P. 1977. Le mécanisme de la fermentation malolactique des vins. *Connaissance vigne et vin.* 11(1):734-91.
- 28 Margalith, P.Z. 1981. *Flavor microbiology*. Charles Thomas Pub. Springfield, Ill. U.S.A.:37-60.
- 29 Margalith, P.Z. y Schwartz, Y. 1970. Flavor and microorganisms. In: *Advances in applied microbiology.* 12: 35-88.
- 30 Marshall, V.M. 1987. *J. Dairy Res.* 54:559-574.
- 31 Marshall, V.M. 1993. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J. Soc. Dairy Tech.* 46(2):49-93.
- 32 Marshall, V.M. y Cole, W.M., 1983. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavor production in fermented milks. *J. Dairy Res.* 50:375-379.
- 33 Mascaro, A. 1993. Las propiedades sensoriales del cacao. Origen, desarrollo y evaluación. *Alimentaria.* 244:85-89.
- 34 McGregor, J.U. y White, C.H. 1987. Effect of sweeteners on major volatile compounds and flavor of yoghurt. *J. Dairy Sci.* 70:1828-1834.
- 35 Merory, J. 1968. *Food flavorings. Composition, manufacture and use*. The AVI Pub. Co. Inc. Westport, Conn., U.S.A.
- 36 Montaña, A. Sánchez, A.H. y de-Castro, A. 1993. Controlling fermentation of Spanish-type green olives. *J. Food Sci.* 58(4):842-844, 852.
- 37 Montedoro, G., Bertoccioli, M. y Anichini, F. 1978. Aroma analysis of Virgin olive oil by head space volatiles and extraction (polyphenols) techniques. In *Flavor of Foods and Beverages*. Chemistry and Technology. G. Charalambous y G.E. Inglett (ed.). Academic Press. N.Y., U.S.A. pp.247-281.
- 38 Nsofor, L.M., Nsofor, O.N. y Nwachukuo, K.E. 1992. Soya-yoghurt starter culture development from fermented tropical vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 60:515-518.
- 39 Ofuya, C.O. y Nnajiotor, C. 1989. Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gan. *J. Appl. Bacteriol.* 66:37-42.
- 40 Okoli, C. y Adeyemi, A. 1989. Manufacturing of ogi from malted (*germinated*) corn (*Zea mays*): evaluation of chemical, pasting and sensory properties. *J. Food Sci.* 4:971-973.
- 41 Olguin, P., Mozzueda, E.; Gallardo, F. y Escamilla, L. 1988. Análisis sensorial de pozol y del atole de maíz agrio. Res. trabajos libres. XVIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ATAM. Tec. Aliment. (Méx.). 23(4):26.
- 42 Pilone, A.A., Waghmare, W.M. y Gupta, S.K. 1980. Lactic acid fermentation of soy milk - A review. *Proc. Biochem.* 15(5):9-13.
- 43 Pilone, G.J., Kunkee, R.E. y Webb, A.D. 1966. Chemical characterization of wines fermented with various malo-lactic bacteria. *Appl. Microbiol.* 14(4):608-615.
- 44 Pino, J.A. 1993. Los componentes volátiles del cacao: métodos de análisis y resultados cualitativos. *Alimentaria.* 248:85-92.
- 45 Pollock, C. 1994. *Ingredients/Aditivos*. Flavor development in the 1990s. *Food Technol.* 48(2):141.
- 46 Prots, C., Lee, C.Y., Giampaoli, P. y Richard, H. 1993. Extraction of cookie aroma compounds from aqueous and dough model system. *J. Food Sci.* 58(3):586-608.
- 47 Pszczola, D.E. (ed.). 1994a. Product update. New ingredients and applications. *Food Tech.* 48(1):114-128.
- 48 Pszczola, D.E. (ed.). 1994b. Products & literature. *Food Tech.* 48(1):130-132.
- 49 Rainbow, C. 1963. Brewer's yeasts. En *Biochemistry of Industrial Microorganisms*. C. Rainbow y A.H. Rose (ed.). Academic Press. N.Y., USA. pp. 199-204.
- 50 Sanders, M.E., Wasserman, B. y Foegeding, A. 1993. Research needs in biotechnology. Special report. *Food Technol. Supplement.* 47(3):18.S-21.S.

51. Sandine, W.E., Daly, C., Elliker, P.R. y Vedamuthu, E.R. 1972. Causes and control of culture related flavor defects in cultured dairy products. *J. Dairy Sci.* 55:1031.
52. SANOFI Bio-Industries, Inc.-Div. Cultures & Enzymes. 1994. Catálogo de ingredientes lácteos enzimáticamente modificados. Waukesha, Wi. U.S.A.
53. Secretaría de Salud (S.S.). 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, establecimientos, productos y servicios. Diario Oficial de la Federación, 18 enero 1a Sección, título 9°, artículo 688. 412(11):77. México.
54. Selfedge, T.B. y Amerine, M.A. 1978. Odor thresholds and interactions of ethyl acetate and diacetyl in an artificial wine medium. *Am. J. Enol. Vític.* 29(1):1-6.
55. Shimazu, Y., Uehara, M. y Watanabe, M. 1985. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin, and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 49(7):2147-2157.
56. Shinohara, T., Shimazu, Y. y Watanabe, M. 1979. Dosage de l'acétone et du lactate d'éthyle dans les vins par chromatographie en phase gazeuse, et étude de leur formation dans les vins. *Agric. Biol. Chem.* 43(12):2569-2577.
57. Shirte-Keller, J.P., Reinecius, G.A. y Hatchwell, L.C. 1994. Flavor interactions with fat replacers: effect of oil level. *J. Food. Sci.* 59(4):813-815, 875.
58. Smith, B.L. (ed.). 1990. Codex Alimentarius. Abridge version. Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) y World Health Organization (WHO). Roma, Italia. pp.3.1-3.2, 3.53-3.55, 12.7, 12.10, 12.20, 12.22.
59. Sociedad Mexicana de Saboristas (SMS) y Asociación de Tecnólogos en Alimentos de México (ATAM). 1997. Notas del curso: Introducción a la tecnología de sabores. México, D.F.
60. Tamime, A.Y. y Deeth, H.C. 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food. Prot.* 43(12):939-977.
61. Vasavada, P.C. y White, C.H. 1979. Quality of commercial butter-milk. *J. Dairy Sci.* 62:802-806.
62. Voudouris, E.C., Komari, M.E. y Pattacou, B. 1978. Flavor development of white and provincial Greek bread, traditional and rural breadmaking process. En *Flavors of Foods and Beverages. Chemistry and Technology*. G. Charalambous y G.E. Inglett (ed.). Academic Press. N.Y., U.S.A. pp. 57-64.
63. Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. y Lee, T.H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vític.* 36(4):302-313.
64. Xanthopoulos, V., Picque, D., Bassit, C.Y. y Corrieu, G. 1994. Methods for the determination of aroma compounds in dairy products: a comparative study. *J. Dairy Res.* 61:289-297.
65. Yadav, J. y Srinivasan, A. 1985. Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* on the flavour of ghee (clarified butterfat). *J. Dairy. Res.* 52:547-553.
66. Yamanishi, T. 1978. The aroma of various teas. En *Flavor of Foods and Beverages. Chemistry and Technology*. G. Charalambous y G.E. Inglett (ed.). Academic Press. N.Y., U.S.A. pp. 305-328.

**Convocatoria  
para la  
participación  
con trabajos  
de  
investigación**

**XXV  
Congreso  
Nacional  
de Ciencia y  
Tecnología**

*Se convoca a todos los profesionales y estudiantes que realizan labores de Investigación y desarrollo en el área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, a participar en nuestro CONGRESO NACIONAL, que se efectuará del 23 al 28 de septiembre de 1996, en Cintermex Monterrey; Nuevo León.*

*La presentación de trabajos comprende dos modalidades:*

**ORAL Y CARTEL**

**Fecha límite para la recepción  
de resúmenes en ambas modalidades: 10 junio**  
**Notificación de aceptación resúmenes: 14 junio**  
**Trabajos "in extenso" (no habrá prórroga): 12 julio**

Los autores interesados en participar en algunos de los cuatro concursos (Profesional, Estudiantil, Cartel e Industrial), podrán hacerlo en caso de que su trabajo sea aceptado para su presentación en el CONGRESO, y de que este actualizando en el pago de su membresía



From: Professor Duncan E S Stewart-Tull  
 Chairman of Editorial Boards

Division of Infection and Immunity,  
 Institute of Biomedical and Life Sciences,  
 Joseph Black Building,  
 University of Glasgow,  
 Glasgow, G12 8QQ, UK

2 August 1999.

Dear Dr. Escamilla-Hurtado,

Accession No. 7227/5/99 (old 7005/12/98)

Thank you very much for sending me your revised paper. I am pleased to report that this is now accepted for publication in the Journal of Applied Microbiology. If there are no further queries in regard to the presentation of the manuscript you will receive proofs from the publishers in due course. If you have any further queries regarding publication you should contact the publishers directly - **Mr. Dean Gurden, Blackwell Science, 25 John Street, London WC1 2BL**, Tel: 0171 404 4101 quoting the Accession Number at the top of this letter.

Once again thank you for considering publishing your work in the official Journal of the Society of Applied Microbiology.

With best wishes,  
 Yours sincerely,

*Helen Miller*

RP Prof. D.E.S. Stewart-Tull.

Please return these proofs

25 NOV 1999

## Effect of some nutritional and environmental parameters on the production of diacetyl and on starch consumption by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in submerged cultures

M.L. Escamilla<sup>1</sup>, S.E. Valdés<sup>2</sup>, J. Soriano<sup>1</sup> and A. Tomasini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. Biotecnología, University of Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City and <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Campus 1, University of Nac. Autónoma de México, Cuautitlán, México

Received 10 May 1999; accepted 28 July 1999

M.L. ESCAMILLA, S.E. VALDÉS, J. SORIANO AND A. TOMASINI 2000. Three series of 5-day submerged cultures with *Pediococcus pentosaceus* MITJ-10 and *Lactobacillus acidophilus* Hansen 1748 were carried out in starch-based media, and the effect of cultural factors on the changes of starch, diacetyl and amylase activity determined. In axenic cultures, *Ped. pentosaceus* MITJ-10 produced more diacetyl (63.27 mg l<sup>-1</sup>) by adding glucose, yeast extract and CaCO<sub>3</sub> ( $P < 0.01$ ), at 28 °C ( $P < 0.05$ ); but more starch was consumed (18.4 g l<sup>-1</sup>) in the absence of glucose ( $P < 0.01$ ). *Lact. acidophilus* Hansen 1748 consumed more starch (26.56 g l<sup>-1</sup>) at 28 °C, with CaCO<sub>3</sub>, glucose ( $P < 0.01$ ) and yeast extract ( $P < 0.05$ ); however, the amylolytic activity (10 077 U l<sup>-1</sup>) was favoured at 35 °C ( $P < 0.01$ ). Little starch was consumed in mixed cultures due to the low pH; nevertheless, diacetyl content rose to 135.76 mg l<sup>-1</sup> at 32 °C ( $P < 0.01$ ). Therefore, both studied strains might be useful to produce aromatic extensors from starchy substrates. These natural aromatic extensors are of interest to the food industry.

### INTRODUCTION

One of the main applications of lactic acid bacteria in the food industry is related to their ability to develop appreciable butter- and cheese-like aromas. Butter aroma contains a great number of compounds; mainly, diacetyl or 2,3-butanedione (CH<sub>3</sub>COC(O)CH<sub>3</sub>) and volatile fatty acids (VFA). Diacetyl concentrations in fermented foods are: 0.5–20 mg l<sup>-1</sup>, in fermented dairy products; 44–62.5 mg kg<sup>-1</sup>, in bakery products and 2.0–5.2 mg kg<sup>-1</sup>, in some indigenous fermented foods (Margalith 1981; Yadav and Srinivasan 1985; Joshi, Godbole and Kanekar 1989; Escamilla *et al.* 1996b). VFA levels must be controlled in the butter aroma to avoid undesirable off-flavours (Vasavada and White 1979; Margalith 1981).

The biosynthesis of diacetyl has been characterized in systems containing citrate and another simple carbon-source by certain

lactic acid bacteria; i.e. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Leucolactis*, growing in milk, wine, beer, or citrate-based synthetic media (Shimazu, Uehara and Watanabe 1985; Cogan 1995; Cogan-Bousquet *et al.* 1990; Escamilla *et al.* 1996a). The production of a butter-like aroma by the fermentation of starchy substrates may be of interest to the food industry. Some lactic acid bacteria are amylolytic, i.e. *Lactobacillus plantarum*, *Lact. acidophilus*, *Lact. amylovorus*, *Lact. cellobiosus*, *Streptococcus bobis* and *Pediococcus damnosus* (Champ *et al.* 1983; Li and Chan 1983; Sen and Chakrabarty 1984; Garvie 1986; Kandler and Weiss 1986; Imam *et al.* 1991; Giraud *et al.* 1993; Olympia *et al.* 1995); however, there is no evidence of production of aroma compounds from starch by these strains.

The main purpose of this work was to determine some of the nutritional and environmental conditions that favour the production of diacetyl, the consumption of starch and the production of extracellular amylase by *Ped. pentosaceus* MITJ-10 and *Lact. acidophilus* Hansen 1748 growing in axenic and mixed submerged cultures.

Correspondence: M.L. Escamilla-Hurtado, Depto. Biotecnología, University of Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purisima, Ap. P 55 535, Deleg. Iztapalapa, C.P. 09340, Mexico City, D.F., Mexico (e-mail: mleh@xanum.uam.mx).

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

*Lactobacillus acidophilus* (strain 1748 CHR-Hansen), and *Pediacoccus pentosaceus* strain MITJ-10, previously isolated from Mexican cider (Verde *et al.* 1995) were used in this work.

### Culture media

The composition of storage medium was ( $\text{g l}^{-1}$  distilled  $\text{H}_2\text{O}$ ): Micro/inoculum broth (Merck), 18.5; soluble starch, 5; agar, 15, and vitamin and mineral solution, 5 ml (indicated below). Propagation medium was used for inocula cultivation ( $\text{g l}^{-1}$  distilled  $\text{H}_2\text{O}$ ): glucose, 5; soluble starch, 10; peptone from casein, 2; yeast extract, 2;  $\text{CaCO}_3$ , 0.3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1, and vitamin and mineral solution, 5 ml. A basal medium was used in all main cultures in which glucose, soluble starch, yeast extract and  $\text{CaCO}_3$  contents were adjusted according to the design in each series.

Vitamin and mineral solution was prepared by dissolving biotin, 640  $\mu\text{g}$ ; folic acid, 320  $\mu\text{g}$ ; a capsule of Viterra-Plus $\mu$  (Pfizer) and a capsule of Calanda $\mu$  (Atlantis), in 40 ml of an ethanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:4, v/v) solution. Liquid and solid media were prepared according to the usual procedures, adjusting the pH to 6.5 before sterilizing at 121 °C for 15 min.

### Preservation of strains and inocula preparation

Slants of sterile preservation medium were prepared in culture tubes and inoculated with the strains; they were incubated at 30 °C for 72 h and kept for short spans at 4 °C. For long-term storage, strains were cultured in plates of the same medium in similar conditions; thereafter, cells were harvested and suspended in propagation medium; then, aliquots of 0.7 ml were transferred into 2-ml vials and 0.3 ml of sterile glycerol was added; the mixture was frozen at -40 °C.

Erlenmeyer flasks with 50 ml of sterile propagation medium were inoculated with heavy loops of a 72-h slant culture of either, *Ped. pentosaceus* MITJ-10 or *Lact. acidophilus* Hansen 1748. These inocula were incubated at 30 °C during 48 h, with agitation at 120 rev  $\text{min}^{-1}$ .

### Starch submerged cultures

Three series of submerged cultures of lactic acid bacteria, growing in starch-based media, were carried out. The basal medium was used, added with the nutrients indicated in the design of each series (see Experimental designs). In all cases, flasks with 100 ml of media were cultured for 5 days, with agitation at 120 rev  $\text{min}^{-1}$ . The first and second series were comprised of axenic cultures of *Ped. pentosaceus* MITJ-10 and

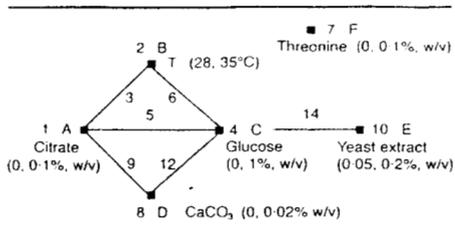
*Lact. acidophilus* Hansen 1748, and were started by adding 1 ml of the corresponding inoculum broth to each culture flask. The third series consisted of mixed cultures growing in a propagation medium, with a soluble starch content adjusted to 5  $\text{g l}^{-1}$ . In this series, 0.5 ml of inoculum broth of each strain was added to start every culture.

### Experimental design and statistical analyses

The series of cultures referred to as equilibrated fractional factorial experiments (FFE) were designed according to the Taguchi methodology, as presented by Ross (1989), in order to estimate the main factor and some interaction effects on the following response variables: production of diacetyl, consumption of starch, and production of extracellular amylase, after 5 days of fermentation (final values minus initial values). The same treatments were applied to both strains when they were grown in axenic cultures (first and second series) in order to clarify their specific responses; since both strains are able to grow from starch, but only *Ped. pentosaceus* is able to produce diacetyl (Verde *et al.* 1995). A series of mixed cultures were carried out thereafter, applying the selected conditions and evaluating only the first two variables of response mentioned. Cultures were carried out in triplicate for the first series, and in duplicate for the other two.

The factors evaluated were those generally known as main compounds and environmental culture conditions that affect lactic acid bacteria upon the production of diacetyl (Margalith 1981; Shimazu *et al.* 1985; Cogan 1995; Cogan *et al.* 1996; Escamilla *et al.* 1996a) and amylases (Champ *et al.* 1983; Li and Chan 1983; Sen and Chakrabarty 1984; Giraud *et al.* 1993; Olympia *et al.* 1995). Most of the two-factor interaction effects and the possibility of producing acetaldehyde from threonine (Marshall 1993) were also evaluated.

In the first series, the effects of six factors with two levels of variation: A, citrate; B, temperature; C, glucose; D,  $\text{CaCO}_3$ ; E, yeast extract; F, threonine; and six two-factor interactions between them were evaluated, taking into account the preceding research in the field, as indicated above. Literals (A to F) were assigned to factors in order of importance; then, the six most important two-factor interactions (leaving threonine as an independent factor) were proposed. From the Tables D.1 (Ross 1989) it was deduced that 16 trials had to be done to ensure that all main effects be unconfounded and the two-factor interactions be confounded with each other, with the minimum amount of test (resolution level: 2). The linear graph shown in Fig. 1 was designed following the methodology of Taguchi. This and the Triangular Table I.16 guided to a valid allocation of the factors and interactions into a two-column 16-trial (L16) orthogonal array (OA) which is one of the FFE equilibrated matrices developed by Taguchi. This OA allowed 14 error degrees of freedom to be traded for factor (or interaction) degrees of freedom; the



**Figure 1** Linear graph assigning factors and interactions to the Taguchi L16 orthogonal array, in the first series of axenic cultures with lactic acid bacteria in starch-based media. Factors evaluated in two levels, ■; two-factor interactions

unassigned columns: 11, 13 and 15, directly estimated error variance and had one error degree of freedom per column.

The design of the succeeding series was proposed based on the results of the first series, applying again equal experimental conditions to both strains. The factors and levels evaluated in the second series were: Factor A: CaCO<sub>3</sub> at 0.01 and 0.03% (w/v), and Factor B: temperature at 28 and 35 °C. These factors and their interaction (A-B) were assigned to columns 1-3 of a L8 OA, guided by the corresponding L8 Triangular Table. Finally, the third series (mixed cultures) was structured in order to evaluate only one factor: the temperature, at three levels: 28, 32 and 35 °C. This factor was allocated in the first column of an L9 OA.

Data from the OA of each series were analysed by conducting ANOVA, having the smaller column effects pooled-up, in order to form an estimate of error variance with higher degrees of freedom associated with that estimate (Ross 1989). Null hypothesis,  $H_0$ , in the  $F$ -tests considered that estimates of sample variances are equal at a certain confidence level; the alternate hypothesis,  $H_1$ , considered that the sample variances are significantly unequal, at the same confidence level. Other analysis of data calculated were: the percent contribution ( $P_c$ ), which is the portion of the total variation attributed to each significant factor or interaction; and the equations for estimating the mean of each variable of response ( $F$ , equation 1) depending upon the additivity of the factorial effects. This calculation allows the prediction of the mean of the dependent variable if an experiment is conducted with the best combination of conditions.

$$\mu_i = \bar{F}_{1_{i_1}} + \bar{F}_{2_{i_2}} + \dots + \bar{F}_{n_{i_n}} - \text{d.f.} (\mu_{T_{i_{\text{total}}}}) \quad \text{Equation 1}$$

where:  $\mu_i$  is the mean of the dependent variable under respective conditions,  $\bar{F}_1$  is the mean of all the data of certain dependent variable under the best level of one significant factor (or interaction). Subscript is the level number.  $\bar{F}_2 \dots \bar{F}_n$  are as  $\bar{F}_1$ . Literals are traded by those presented in Fig.

1. d.f. represents degrees of freedom (one less than the number of items added to estimate the mean).  $\mu_{T_{\text{total}}}$  is the mean of the entire experimental results.

Only the results from the best level of each significant factor or interaction was introduced in the equation. The level 1 of a significant interaction means that both interacting factors are at the same level; while the interaction level 2 refers to dissimilar levels of the factors.

### Sampling and analytical procedures

In each culture, two flasks were analysed at time 0 (initial samples), and other two after 5 days of cultivation (final samples). Analytical parameters were determined in duplicate; therefore, one sample referred to six replicates in the first series and to four replicates in the other two series. The mean, standard deviation and dispersion of data of the entire series was summarized by calculating the mean of the coefficient of variation:  $C.V.$  for each analytical parameter.

The pH was measured with a potentiometer; thereafter, an aliquot of 20 ml was frozen at -18 °C. This sample was thawed later, warmed-up to 60 °C over 30 min, and homogenized in a shaker; the content of total carbohydrates was determined with the anthrone reagent after cooling to 20 °C (White and Kennedy 1986). The remaining broth was centrifuged twice at 4000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was analysed for lactate, with the  $\beta$ -hydroxydiphenyl reagent (Barnett 1951); and reducing sugars, with the DNS reagent (Miller 1959).

In the first series, clarified broth was used to determine citrate (AOAC 1980) and diacetyl contents; for the last one, a modification of the spectrophotometric method of Voges-Proskauer-Coblentz (McFaddin 1980) was applied as follows: 1 ml of distilled water and 2 ml of a recently purified 1.3% (w/v)  $\alpha$ -naphthol solution was added to 1.0 ml of clarified broth in a test tube; then 2 ml of a creatinine-KOH (0.3%/1%, w/v) solution was added, with soft mixing after every addition. Tubes were protected from air and light and left for 15 min; finally, the optical density was measured at 530 nm. Diacetyl contents were calculated against a standard curve, in a range of 0-60  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ( $r^2 = 0.9988$ ). Under these conditions, oxidation of acetoin was prevented and colour was attributed only to the diacetyl content.

The acetaldehyde content was analysed in the clarified broth in the first series following the spectrophotometric method of Rebelein (Amerine and Ough 1980).

A gas chromatographic (GC) method for the analysis of volatile compounds was applied in the second and third series. In this case, diacetyl and the volatile fatty acids (acetic, propionic and butyric acids) were determined. The conditions for GC analysis were: the pH of each clarified broth (1.0 ml) was adjusted to 2.0, with 25  $\mu\text{l}$  of a HCl/H<sub>2</sub>O (1:1) solution in a 2-ml vial; thereafter, each broth was centrifuged at 4000 g

(30 min, 4°C). Aliquots of 0.3 µl of the supernatant were analysed in a Hewlett-Packard GC system 5890, with an AT-1000 Megabore column (10 m × 0.53 mm; film thickness: 1.2 µm).  $T_{inj}$  = 200°C. Oven programme was:  $T_1$  = 80°C;  $t_1$  = 1 min;  $R$  = 10°C min<sup>-1</sup>;  $T_2$  = 150°C;  $t_2$  = 6 min.  $N_2$  = 5 ml min<sup>-1</sup>. For FID  $T_{det}$  = 220°C; air = 200–300 ml min<sup>-1</sup>;  $H_2$  = 20–30 ml min<sup>-1</sup> and Att. = 1. Standard curves were analysed with five replicates of mixed solutions, 1–10 mmol l<sup>-1</sup> of diacetyl and VFA.

#### Viable count of lactic acid bacteria

In the third series, viable counts of lactic acid bacteria were determined in the axenic inocula in order to calculate the initial cell counts in the main cultures; final cell counts were also determined after 5 days of incubation, ahead of any other analysis. Serial suspensions of diluted broth ( $10^{-1}$ – $10^{-6}$ ) were prepared with sterile Ringer's solution; then, aliquots of 0.1 ml were smeared on plates of storage medium in duplicate, with added bromocresol green (50 mg l<sup>-1</sup>) as a pH indicator. The plates were incubated at 30°C for 24–48 h and viable counts of acid forming colonies were calculated as colony forming units per millilitre.

#### Assay of extracellular amylase

Reducing sugars produced from starch were determined *in vitro* in initial and final samples of the first and second series, considering the clarified broths as the sources of crude enzyme. The method used was a modification of amylase assays for lactic acid bacteria (Li and Chan 1983; Sen and Chakrabarty 1984). Aliquots of 1.5 ml of the clarified broth were incubated at 30 or 37°C for 10 min in test tubes, with 2 ml of a 0.072-g l<sup>-1</sup> soluble starch solution in 0.05-mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 5.5) and 0.7 ml of the buffer, agitating occasionally. The reaction was stopped by adding 0.3 ml of a cold 2 mol l<sup>-1</sup> NaOH solution, keeping the assay mixture in an ice bath. Reducing sugars were determined in the solution with the DNS reactive (Miller 1959). Results were corrected by subtracting the original reducing sugar content in the broth. One unit of extracellular amylase activity (U) was defined as the amount of enzyme that produced 1 µmol of glucose per min, under the experimental conditions.

## RESULTS

#### Effect of some environmental and nutritional parameters on starch consumption and diacetyl production by *Ped. pentosaceus* MITJ-10

The minimum and maximum values obtained for each parameter of initial and end cultures of the first series, are shown

in Table 1. The dispersion of data was summarized for each parameter and represented as the mean of the coefficient of variation ( $\bar{C}_v$ , in percentage) calculated in the entire series; providing that all but few data from the analysis of diacetyl, resulted in C.V. < 10%. The explanation of this hazard is presented afterwards.

The pH of media decreased in cultures lacking citrate but with added glucose; while in the opposite case, the pH rose. The culture with the largest decrease (-2.03) was cultured at 28°C, with added glucose, yeast extract and threonine. Citrate diminished in all cultures, but highest consumption (-0.97 g l<sup>-1</sup>) was observed in the culture incubated at 35°C without glucose, yeast extract and threonine, but with added CaCO<sub>3</sub>. Little production of lactic acid was observed in this series; the highest production (1.56 g l<sup>-1</sup>) occurred at 35°C in the culture containing glucose and yeast extract, but in the absence of citrate and threonine.

The culture incubated at 35°C with the highest levels of citrate, yeast extract, glucose and threonine, but without CaCO<sub>3</sub>, presented the best consumption of total carbohydrates (-17.26 g l<sup>-1</sup>). Changes of reducing sugars were small in all cultures, due to the balance between production of glucose from starch hydrolysis and consumption; the culture with the maximum diminution (-2.91 g l<sup>-1</sup>) had the highest levels of citrate, glucose, threonine, yeast extract and temperature (35°C). No extracellular amylolytic activity was detected; although, starch was consumed in all cases, the maximum value being -18.4 g l<sup>-1</sup>. The effects of some culture conditions on starch consumption by this strain were calculated by introducing the  $y$ -data indicated in Table 2 into the L16 OA, following the methodology of Taguchi (Ross 1989). The significant contribution of factors and interactions calculated by the ANOVA, and by the percent contribution analysis are summarized in Table 3. Those results indicate that the absence of glucose (Factor C, level 1), and its interaction with the highest level of CaCO<sub>3</sub> (interaction C × D, level 2) were significant for starch consumption *in situ*. Equation 2 was calculated based on the notations in Equation 1, in order to predict the mean of starch consumption ( $\mu_1$ ), considering the contribution of the significant factor and interaction mentioned above:

$$\mu_1 = \bar{C}_1 + \bar{C} - \bar{D}_2 - \text{d.f.} (\mu_{T_{max}}) = 12.68 +$$

$$10.73 - 1 (11.7) = 11.7 \text{ g l}^{-1} \quad \text{Equation 2}$$

Culture broths presented a light butter aroma, due to diacetyl production in 10 of the 16 trials of this series, but acetaldehyde was not detected in any sample. The high value obtained for the  $\bar{C}_v$  of diacetyl (Table 1) was due to the low sensibility of the spectrophotometric method in samples with very low diacetyl content (< 1.65 mg l<sup>-1</sup>); instead, all the samples with concentrations up to this value had low dispersion of data (C.V. < 10%). The  $y$ -data of diacetyl pro-

**Table 1** Parameters analysed in the first series of axenic cultures of lactic acid bacteria growing in starch-based media

|  | <i>Pedococcus pentosaceus</i>   |                                 |                 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |                                 |                 |
|--|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------|
|  | 0 days culture<br>(Min., Max.)* | 5 days culture<br>(Min., Max.)* | C.V. †<br>(± %) | 0 days culture<br>(Min., Max.)*  | 5 days culture<br>(Min., Max.)* | C.V. †<br>(± %) |
| pH   | 6.40, 6.90                      | 4.70, 6.92                      | 0.68            | 6.33, 6.96                       | 4.85, 6.76                      | 0.87            |
| Citric acid (g l <sup>-1</sup> )           | 0, 1.46                         | 0.88, 1.22                      | 2.73            | 0, 0.96                          | 0.83, 0.91                      | 4.68            |
| Lactic acid (g l <sup>-1</sup> )           | 0, 0.17                         | 0.12, 1.71                      | 5.11            | 0, 0.93                          | 0.02, 3.54                      | 6.64            |
| Total carbohydrates (g l <sup>-1</sup> )   | 19.19, 35.80                    | 9.83, 26.50                     | 5.44            | 23.42, 56.56                     | 21.44, 51.85                    | 2.40            |
| Reducing sugars (g l <sup>-1</sup> )       | 2.92, 7.08                      | 2.94, 5.41                      | 1.19            | 0, 6.77                          | 0.56, 6.20                      | 2.40            |
| Starch ‡ (g l <sup>-1</sup> )              | 14.63, 32.81                    | 3.26, 21.97                     | -               | 23.42, 51.44                     | 21.44, 45.79                    | -               |
| Diacetyl § (mg l <sup>-1</sup> )           | 0, 2.11                         | 1.23, 8.31                      | 31.11           | 0                                | 0                               | -               |
| Amylolytic activity (U l <sup>-1</sup> ) ¶ | 0                               | 0                               | -               | 0, 4511.4                        | 0, 100767                       | 6.79            |

\*Minimum and maximum values obtained in the series of 16 trials, at the beginning or end of the cultures.

†C.V., as mean of the coefficient of variation. C.V. = (standard deviation/mean) × 100, calculated in every sample of the entire series.

‡One sample refers to six replicates (each trial in triplicate × analytical determinations in duplicate).

§Starch, as the calculated value in each sample: total carbohydrates minus reducing sugars.

¶Determined by the modified Voges-Proskauer method.

¶U: Unit, as amount of enzyme producing 1 µmol reducing sugars per min (37 °C, pH = 5.5).

**Table 2** Data (final - initial values) from starch-submerged cultures with lactic acid bacteria introduced in Taguchi orthogonal arrays

| Trial number | Series 1 with a L16 OA*        |                                   |                                |   | Series 2 with a L* OA*         |                                   |                                |   | Series 3 with a L9 OA†         |                                   |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|
|              | <i>Ped. pentosaceus</i>        |                                   | <i>Lact. acidophilus</i>       |   | <i>Ped. pentosaceus</i>        |                                   | <i>Lact. acidophilus</i>       |   |                                |                                   |
|              | Starch<br>(g l <sup>-1</sup> ) | Diacetyl<br>(mg l <sup>-1</sup> ) | Starch<br>(g l <sup>-1</sup> ) | Amylolytic<br>activity<br>(U l <sup>-1</sup> )‡ | Starch<br>(g l <sup>-1</sup> ) | Diacetyl<br>(mg l <sup>-1</sup> ) | Starch<br>(g l <sup>-1</sup> ) | Amylolytic<br>activity<br>(U l <sup>-1</sup> )‡ | Starch<br>(g l <sup>-1</sup> ) | Diacetyl<br>(mg l <sup>-1</sup> ) |
| 1            | 7.37                           | 1.31                              | -1.81                          | 0   | 7.61                           | 62.11                             | -4.27                          | 0   | -0.300                         | 45.16                             |
| 2            | 9.23                           | 4.47                              | -12.02                         | 0   | 5.50                           | 52.01                             | 3.53                           | 0   | -0.281                         | 42.73                             |
| 3            | 1.90                           | 4.25                              | -21.38                         | 273   | -4.96                          | 10.28                             | -2.72                          | 1074  | -0.290                         | 39.86                             |
| 4            | 1.45                           | 5.89                              | -26.13                         | 2608  | -4.52                          | 3.91                              | -3.86                          | 1177  | -0.036                         | 56.78                             |
| 5            | 13.17                          | 2.04                              | -13.54                         | 0   | -4.78                          | 60.17                             | -4.14                          | 0   | -0.034                         | 64.88                             |
| 6            | 14.50                          | 0.32                              | -1.11                          | 0   | -5.38                          | 66.37                             | -5.18                          | 0   | -0.370                         | 62.00                             |
| 7            | 7.14                           | 2.46                              | -7.91                          | 6093  | 4.61                           | 42.33                             | -5.42                          | 1433  | -0.192                         | 53.43                             |
| 8            | 2.13                           | 2.13                              | -2.83                          | 5620  | 4.57                           | 42.33                             | -4.54                          | 1520  | -0.176                         | 46.90                             |
| 9            | 9.42                           | 0.86                              | -0.04                          | 0   |                                |                                   |                                |   | -0.184                         | 44.02                             |
| 10           | 16.69                          | 4.74                              | -1.98                          | 0   |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 11           | 18.39                          | 3.23                              | -26.56                         | 1026  |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 12           | 0.29                           | 5.01                              | -25.39                         | 3230  |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 13           | 17.34                          | 1.55                              | -2.01                          | 0   |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 14           | 13.74                          | 0.77                              | -1.21                          | 0   |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 15           | 4.31                           | 7.77                              | -1.66                          | 386   |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |
| 16           | 2.97                           | 0.70                              | -1.89                          | 232   |                                |                                   |                                |   |                                |                                   |

\*Calculated from mean results in each trial of axenic submerged cultures.

†Calculated from mean results in each trial of mixed submerged cultures of *Ped. pentosaceus* and *Lact. acidophilus*.

‡Unit, as amount of enzyme producing 1 µmol reducing sugar per min (37 °C, pH = 5.5).

Table 3. Summary of statistical analysis of three series of submerged cultures in starch media with lactic acid bacteria

| Significant factors and interactions     | Selected levels†, percent contribution to the total effects (subscripts)‡ and significant levels (superscripts)§ |                            |  |                           |                                   |                         |
|--|--|----------------------------|--|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
|  | Series 1. Axenic submerged cultures in L16 OA  |                            | Series 2. Axenic submerged cultures in L8 OA |                           | Series 3. Mixed cultures in L9 OA |                         |
|  | <i>Ped. pentosaceus</i>  |                            | <i>Lact. acidophilus</i>                     |                           | <i>Lact. acidophilus</i>          |                         |
|  | Starch   | Diacetyl                   | Starch                                       | Amylolytic activity       | Starch                            | Diacetyl                |
| Glucose (% <sub>0</sub> , w/v)           | 0/0 <sub>(1,1)</sub> ***   | 1/2 <sub>(2,2)</sub> ***   | 1/2 <sub>(2,2)</sub> ***                     | 1/0 <sub>(1,1)</sub> ***  | -                                 | -                       |
| Temperature (°C)                         | -  | 28/28 <sub>(1,1)</sub> *** | 28/30 <sub>(2,1)</sub> ***                   | -                         | 35/35 <sub>(2,1)</sub> ***        | 32 <sub>(2,2)</sub> *** |
| *Yeast extract (% <sub>0</sub> , w/v)    | -  | 0/2 <sub>(1,1)</sub> ***   | 0/2 <sub>(1,1)</sub> ***                     | -                         | -                                 | -                       |
| CaCO <sub>3</sub> (% <sub>0</sub> , w/v) | -  | -                          | -  | 0/0 <sub>(1,1)</sub> **   | 0/0 <sub>(1,1)</sub> ***          | -                       |
| Citrate (% <sub>0</sub> , w/v)           | -  | -                          | -  | 0/0 <sub>(1,1)</sub> **   | -                                 | -                       |
| Threonine (% <sub>0</sub> , w/v)         | -  | -                          | -  | 0/0 <sub>(1,1)</sub> **   | -                                 | -                       |
| T/Gluc.                                  | -  | -                          | 28/1 <sub>(1,1)</sub> ***                    | -                         | -                                 | -                       |
| T/CaCO <sub>3</sub>                      | -  | -                          | -  | 35/0 <sub>(1,1)</sub> *** | -                                 | -                       |
| T/Citrate                                | -  | -                          | -  | 28/0 <sub>(1,1)</sub> **  | -                                 | -                       |
| Gluc./CaCO <sub>3</sub>                  | 0/0 <sub>(1,1)</sub> **  | -                          | -  | 0/1 <sub>(1,1)</sub> **   | -                                 | -                       |
| Citr./Gluc.                              | -  | -                          | -  | -                         | -                                 | -                       |

† Selected level of each significant factor or interaction.

‡ Percent contribution to the total effect: P<sup>0/0</sup>.

§ Significant levels: \*P &lt; 0.1; \*\*P &lt; 0.05; \*\*\*P &lt; 0.01.

duction are listed in Table 2, and the Taguchi statistical analysis is summarized in Table 3. These results indicated that diacetyl production was favoured by the highest levels of yeast extract ( $E_2$ ), glucose ( $C_2$ ) and a temperature of 28 °C ( $B_1$ ); and the best increment was: 7.77 mg l<sup>-1</sup>. The predicted mean diacetyl production ( $\mu_2$ ) was calculated in Equation 3, when the selected conditions of cultivation were substituted in Equation 1.

$$\mu_2 = \bar{E}_2 + \bar{C}_2 + \bar{B}_1 \cdot d.f. (\mu_{1, \text{opt}}) = 4.24 + 3.93 + 3.72 - 2 (2.97) = 5.95 \text{ mg l}^{-1} \quad \text{Equation 3}$$

#### Effects of some environmental and nutritional parameters on starch consumption by *Lact. acidophilus* Hansen 1748

Results of chemical analysis corresponding with the cultures of *Lact. acidophilus* Hansen 1748 in the first series are summarized in Table 1, as previously indicated for *Ped. pentosaceus*. The C.V. values of all parameters calculated in each sample of the series were under 10% and their mean values are also shown in Table 1. This strain was not able to produce either diacetyl or acetaldehyde.

Addition of glucose favoured the reduction of pH, the strongest change (-1.68) occurred in the culture at 35 °C, with yeast extract and glucose, and without citrate, threonine and CaCO<sub>3</sub>. Citrate was scarcely consumed and diacetyl was not produced in any culture of this series; the greatest citrate decrease was: -0.06 g l<sup>-1</sup>, observed in the culture at 35 °C, with the highest level of yeast extract, but without glucose, threonine and CaCO<sub>3</sub>. Lactic acid production was favoured by the presence of glucose; the greatest production (2.62 g l<sup>-1</sup>) was found at 35 °C with glucose, yeast extract, citrate and threonine, and in the absence of CaCO<sub>3</sub>.

Total carbohydrates diminished notably in all cultures, with a maximum consumption (-27 g l<sup>-1</sup>) in the culture carried out at 28 °C, in the presence of glucose and citrate and without yeast extract, threonine and CaCO<sub>3</sub>. The content of reducing sugars in culture broths decreased slightly, due to their consumption and production during starch hydrolysis. Conditions for maximum consumption (-0.75 g l<sup>-1</sup>) were the same as those for lactic acid production.

Values of starch consumption (Table 2) were introduced in the L8 OA of Taguchi as  $\gamma$ -data; following the procedure indicated in Methods. The results of the statistical analysis calculated in this series are summarized in Table 3; according to this, it was clear that the conditions which significantly influenced starch consumption by *Lact. acidophilus* Hansen 1748 were the highest levels of glucose ( $C_2$ ) and yeast extract ( $E_2$ ), the temperature of 28 °C ( $B_1$ ), and the interaction between the indicated levels of glucose and temperature ( $B-C_2$ ). The best starch consumption as: -26.56 g l<sup>-1</sup>. Selected conditions were considered for predicting the mean starch

consumption ( $\mu_1$ ), in Equation 4, considering the explanation of Equation 1.

$$\mu_1 = \bar{B} - \bar{C}_2 + \bar{B}_1 + \bar{C}_2 + \bar{E}_2 \cdot d.f. (\mu_{1, \text{opt}}) = 14.67 + 14.41 + 14.22 + 11.33 - 3 (13.66) = 13.66 \text{ g l}^{-1} \quad \text{Equation 4}$$

It was interesting to note that extracellular amylase activity assayed *in vitro* was observed only in cultures containing glucose. Changes between initial and final activities in this series (Table 2) were statistically analysed. Results presented in Table 3 confirmed that the presence of glucose ( $C_2$ ) was the most significant condition, and that the presence of citrate ( $A_2$ ) and threonine ( $F_2$ ) were both unfavourable to the amylase activity in *Lact. acidophilus*. Maximum amylolytic activity (6092.78 U l<sup>-1</sup>) was observed in the culture incubated at 35 °C with glucose and yeast extract and without citrate, threonine and CaCO<sub>3</sub>. The predicted mean production of extracellular amylase ( $\mu_4$ ) is presented in Equation 5:

$$\mu_4 = \bar{A}_1 + \bar{C}_2 + \bar{F}_1 + \bar{A} \cdot \bar{B}_2 + \bar{A} \cdot \bar{C}_2 \cdot d.f. (\mu_{1, \text{opt}}) = 1824 + 2434 + 1515 + 1996 + 1824 - 4 (1214) = 4737 \text{ U l}^{-1} \quad \text{Equation 5}$$

#### Design of the second series of axenic cultures

Results from the first series allowed to fix some culture conditions for the second one, as follows: glucose, 1 g l<sup>-1</sup>; yeast extract, 0.2 g l<sup>-1</sup>; citrate and threonine were not added. It was considered convenient to apply the same conditions for both strains, improving pH control by increasing the concentration of CaCO<sub>3</sub>; however, a single temperature of incubation was not selected, because while the level of 28 °C enhanced diacetyl production by *Ped. pentosaceus* MITJ-10 and starch consumption by *Lact. acidophilus* Hansen 1748, the production of extracellular amylase of the last strain was favoured at 35 °C. In the new series, CaCO<sub>3</sub> was factor A (levels: 0.01 and 0.03%, w/v), and temperature was factor B (levels: 28°, 35 °C). The interaction between the two factors (A-B) was also evaluated. The Taguchi method (Ross 1989) was followed when the  $\gamma$ -data were introduced to a L8 OA and statistical analysis was performed, as indicated in Methods.

#### Effects of temperature and CaCO<sub>3</sub> on starch consumption and diacetyl production by *Ped. pentosaceus* MITJ-10

Table 4 summarizes the results of the chemical analysis of this series. The values of C.V. presented were calculated from acceptable C.V. values obtained from every sample (< 10%).

The pH level declined strongly in all cultures; the biggest change (-2.04) occurred in the culture with 0.01% (w/v) of CaCO<sub>3</sub> at 35 °C, but lactic acid was better produced when CaCO<sub>3</sub> was 0.03% (w/v). Conditions that favoured the con-

**Table 4** Parameters analysed in the second series of axenic cultures of lactic acid bacteria growing in starch-based media

|  | <i>Pediococcus pentosaceus</i>  |                                 |                 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |                                 |                 |
|--|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------|
|  | 0 days culture<br>(Min., Max.)* | 5 days culture<br>(Min., Max.)* | C.V. †<br>(± %) | 0 days culture<br>(Min., Max.)*  | 5 days culture<br>(Min., Max.)* | C.V. †<br>(± %) |
| pH   | 6.29, 6.30                      | 4.24, 4.90                      | 0.94            | 6.36, 6.37                       | 4.22, 4.75                      | 0.64            |
| Lactic acid (g l <sup>-1</sup> )           | 0.74, 0.83                      | 0.75, 2.13                      | 1.41            | 0.15, 0.23                       | 1.32, 2.98                      | 8.09            |
| Total carbohydrates (g l <sup>-1</sup> )   | 18.02                           | 8.85, 10.58                     | 3.74            | 16.44, 17.95                     | 9.40, 10.89                     | 6.49            |
| Reducing sugars (g l <sup>-1</sup> )       | 4.69                            | 1.73, 1.86                      | 4.90            | 5.09, 5.72                       | 1.95, 3.23                      | 3.86            |
| Starch ‡ (g l <sup>-1</sup> )              | 13.33                           | 6.77, 8.74                      | –               | 9.72, 11.35                      | 7.45, 8.29                      | –               |
| Diacetyl § (mg l <sup>-1</sup> )           | 36.65                           | 42.74, 98.91                    | 9.53            | 0                                | 0                               | –               |
| Amylolytic activity (U l <sup>-1</sup> ) ¶ | 0                               | 0                               | –               | 0, 18.17                         | 38.72, 3204                     | 4.22            |

\* Minimum and maximum values obtained in the series of eight trials, at the beginning or end of the cultures.

† C.V., as mean of the coefficient of variation, C.V. = (standard deviation/mean) × 100, calculated in every sample of the entire series.

‡ One sample refers to four replicates (each trial in duplicate × analytical determinations in duplicate).

§ Starch, as the calculated value in each sample: total carbohydrates minus reducing sugars.

¶ Determined by gas/liquid chromatography.

¶ U: Unit, as amount of enzyme producing 1 µmol reducing sugars per min (37 °C, pH = 5.5).

sumption of carbohydrates were the lowest level of both factors; the main changes were (g l<sup>-1</sup>): total carbohydrates, – 9.17; reducing sugars, – 2.9%; and starch, – 6.56. Starch consumption as  $y$ -data (Table 2) was statistically analysed (Table 3), finding no significant effects upon this variable.

Diacetyl content was determined by a GC method, since it was more reliable than the spectrophotometric one, even at low concentrations. An attempt to determine acetaldehyde by the same GC method was also performed. As such, it was confirmed that this strain did not produce this aroma compound in starch media. The statistical analysis of  $y$ -data for diacetyl production (Table 2) is summarized in Table 3. The results indicate that both factors and their interaction were significant; the best conditions were: CaCO<sub>3</sub> 0.03%, w/v (A<sub>2</sub>) and 28 °C (B<sub>1</sub>). More diacetyl was produced in this series (63.27 mg l<sup>-1</sup>) than in the first. The predicted mean diacetyl production ( $\mu_6$ ) was calculated in Equation 6. Literals and subscripts are the factors and interaction indicated in the design of the second series.

$$\mu_6 = \bar{A}_2 + \bar{B}_1 + \bar{A} - \bar{B}_2 - d.f. (\mu_{T,ma}) = 52.8 + 60.16 + 49.70 - 2(42.44) = 77.78 \text{ mg l}^{-1} \quad \text{Equation 6}$$

#### Effects of temperature and CaCO<sub>3</sub> on starch consumption and amylolytic activity of *Lact. acidophilus* Hansen 1748

The summary of the results obtained in this series are shown in Table 4; all analytical data had an acceptable dispersion (C.V. < 10%). From the GC analysis, it was confirmed that

*Lact. acidophilus* did not produce diacetyl or acetaldehyde at all.

Maximum lactic acid production (2.75 g l<sup>-1</sup>) and the highest pH decrease (– 2.13) were observed in the same culture, carried out with 0.01% CaCO<sub>3</sub> (w/v) at 28 °C. On the other hand, the level of 0.03% (w/v) of CaCO<sub>3</sub> was more favourable for the consumption of total carbohydrates (– 8.03 g l<sup>-1</sup>) and reducing sugars (– 3.77 g l<sup>-1</sup>).

Results of the Taguchi statistical analysis related to the starch consumption (Table 2) are summarized in Table 3. From these data, it can be deduced that only CaCO<sub>3</sub> had a significant effect on this variable of response, at a level A<sub>2</sub> (0.03%, w/v). The best starch consumption (– 5.42 g l<sup>-1</sup>) was observed at this condition, and at 35 °C. Equation 7 indicates the predicted mean starch consumption ( $\mu_6$ ).

$$\mu_6 = \bar{A}_2 - d.f. (\mu_{T,ma}) = -4.89 - 0(-4.19) = -4.89 \text{ g l}^{-1} \quad \text{Equation 7}$$

Results on the increase of extracellular amylase activity of *Lact. acidophilus* Hansen 1748 after cultivation are shown in Table 2, and the corresponding statistical analysis is presented in Table 3; they indicate that only the temperature of 35 °C (B<sub>2</sub>) was significant. The culture incubated under this condition and with 0.03% (w/v) CaCO<sub>3</sub> added, produced the highest extracellular amylolytic activity of the series: 1520 U l<sup>-1</sup>. However, it was not as high as for the first series. The predicted mean production of extracellular amylase ( $\mu_5$ ) was calculated by Equation 8.

$$\mu_2 = \beta_2 - d.f. (\mu_{t,0.05}) = 2985.3 - 0 (1515.6) = 2985.3 \text{ U l}^{-1} \quad \text{Equation 8}$$

### Mixed cultures

Since starch consumption by *Lact. acidophilus* Hansen 1748 and diacetyl production by *Ped. pentosaceus* MITJ-10 improved when  $\text{CaCO}_3$  was added at the level of 0.03% (w/v), this level was preferred in mixed culture. Temperature still had different effects on each strain in the second series; therefore, it was the sole factor (A) evaluated in mixed cultures, considering three levels: 28, 32 and 35 °C. Dependent variables were the production of diacetyl and starch consumption. The  $y$ -data were introduced to a LOA of Taguchi and analysed as indicated in Methods section; other culture conditions were fixed as in the second series.

Minimum and maximum values of chemical and biological parameters analysed at 0 and 5 days of fermentation and are summarized in Table 5. The dispersion of data from most of the parameters were under a C.V. value of 10%, and their mean values are shown as  $\bar{C.V.}$  in Table 5.

A large reduction in pH was observed in the series, with a maximum of -2.15 at 35 °C. Lactic acid was produced up to 3.08 g l<sup>-1</sup> at 32 °C. The carbohydrate contents (total, reducing sugars and starch) diminished scarcely in mixed cultures when compared with the corresponding values in axenic cultures. The best starch consumption (-0.29 g l<sup>-1</sup>) occurred at

28 °C, but more reducing sugars were consumed (-2.76 g l<sup>-1</sup>) at 32 °C.

The data of starch consumption in mixed cultures observed in Table 2 were the  $y$ -data in the statistical analysis applied of Table 3. According to this, the temperature was highly significant, particularly at 28 °C (A<sub>1</sub>). Equation 9 represents the predicted mean starch consumption ( $\mu_3$ ):

$$\mu_3 = \bar{A}_1 - d.f. (\mu_{t,0.05}) = -0.29 - 0 (0.17) = -0.29 \text{ g l}^{-1} \quad \text{Equation 9}$$

The initial viable counts in mixed cultures were as follows: for *Ped. pentosaceus* MITJ-10,  $9.46 \times 10^5$  c.f.u. ml<sup>-1</sup>, and for *Lact. acidophilus* Hansen 1748,  $8.89 \times 10^4$  c.f.u. ml<sup>-1</sup>, in all cultures. As the colonial morphologies of both strains in final samples were undifferentiated (round, small, flat, soft, brilliant, creamy and with an area of acidification surrounding the colony), only the total viable counts were determined. The highest growth was observed at 32 °C ( $1.18 \times 10^7$  c.f.u. ml<sup>-1</sup>), which was notably higher than that at 35 °C ( $4.51 \times 10^5$  c.f.u. ml<sup>-1</sup>).

Acetic acid was the VFA produced in the highest level, particularly at 32 °C (54.67 mg l<sup>-1</sup>). The  $\bar{C.V.}$  presented in Table 5 was more than 10% because the variability in initial samples, which had the lowest contents, was higher. The most favourable temperatures for producing propionic acid (10.09 mg l<sup>-1</sup>) and butyric acid (8.81 mg l<sup>-1</sup>) were 35 and 28 °C, respectively.

**Table 5** Parameters analysed in the third series of cultures in starch-based media. Mixed culture with *Ped. pentosaceus* and *Lact. acidophilus*

|  | 0 days culture (mean value) | 5 days culture (Min., Max.)* | $\bar{C.V.}$ † (± %) |
|--|-----------------------------|------------------------------|----------------------|
| pH   | 6.73                        | 4.58, 4.69                   | 0.32                 |
| Lactic acid (g l <sup>-1</sup> )   | 0                           | 2.56, 3.08                   | 4.10                 |
| Total carbohydrates (g l <sup>-1</sup> )   | 9.91                        | 7.11, 7.91                   | 1.10                 |
| Reducing sugars (g l <sup>-1</sup> )   | 4.83                        | 2.07, 3.13                   | 2.51                 |
| Starch ‡ (g l <sup>-1</sup> )  | 5.07                        | 4.78, 5.04                   | -                    |
| Acetic acid § (mg l <sup>-1</sup> )  | 50.58                       | 79.42, 105.25                | 14.00                |
| Propionic acid § (mg l <sup>-1</sup> )   | 57.13                       | 59.95, 67.22                 | 2.64                 |
| Butyric acid § (mg l <sup>-1</sup> )   | 31.31                       | 34.15, 40.42                 | 1.53                 |
| Diacetyl § (mg l <sup>-1</sup> )   | 76.06                       | 117.88, 134.76               | 9.87                 |
| Viable counts of lactic acid bacteria (c.f.u. ml <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>7</sup> | 0.103                       | 0.15, 1.28                   | 5.45                 |

\* Minimum and maximum values obtained in the series of 9 trials, at the beginning or end of the cultures.

†  $\bar{C.V.}$ , as mean of the coefficient of variation,  $\bar{C.V.} = (\text{standard deviation}/\text{mean}) \times 100$ , calculated in every sample of the entire series. One sample refers to four replicates (each trial in duplicate × analytical determinations in duplicate).

‡ Starch, as the calculated value in each sample: total carbohydrates minus reducing sugars.

§ Determined by gas/liquid chromatography.

The production of diacetyl, as the main compound in the butter-like aroma, was the most important component studied in this work. Despite the low consumption of carbohydrates and the modest cell growth at 32 °C, diacetyl production was highest at this condition (58.72 mg l<sup>-1</sup>). The  $y$ -data related to the production of diacetyl in the mixed cultures are shown in Table 2. From the corresponding statistical analysis summarized in Table 3, it was clear that the cultivation temperature exerted a significant effect on these cultures, particularly at 32 °C (A<sub>2</sub>). The predicted mean diacetyl production ( $\mu_0$ ) at this temperature was calculated as in Equation 10.

$$\mu_0 = \hat{A}_2 - d.f. (\mu_{T_{max}}) = 61.22 - 0 (50.64) = 61.22 \text{ mg l}^{-1} \quad \text{Equation 10}$$

## DISCUSSION

The highest starch consumption by *Lact. acidophilus* Hansen 1748 was observed in cultures at 28 °C, with added glucose 1% (w/v) and yeast extract 0.2% (w/v). This behaviour was attributed to the activity of one extracellular amylase released to the medium (maximum: 10 076.67 U l<sup>-1</sup> medium). The enzymatic assays were applied in controlled conditions (37 °C and pH = 5.5), and it was observed that more amylase was excreted into the broth in cultures carried out at 32–35 °C, rather than at 28 °C (Table 3). However, since the pH decreased to below 5.0 in cultures carried out at 32–35 °C, the amylases in those broths became reversibly inactivated *in situ*. Therefore, starch consumption was lower in cultures carried out at those temperatures than at 28 °C. Similarly, it was observed that the activities of some cell-linked  $\alpha$ -glucosidases in other strains of *Lact. acidophilus*, were higher at 37–55 °C and pH of 5.0–6.5, decreasing notably beyond those ranges (Champ *et al.* 1983; Li and Chan 1983). Only one strain of this species has presented an extracellular amylase, and it had a very low activity (Champ *et al.* 1983); other strains of *Lact. acidophilus* produced amylases linked to the cell; therefore, the location and the activity produced by *Lact. acidophilus* Hansen 1748 are uncommon findings.

Results showed that the composition of the medium influenced the amount of diacetyl formed by *Ped. pentosaceus* MITJ-10. It was observed that at 28 °C, the addition of 2% (w/v) of yeast extract, 1% (w/v) of glucose to the starch-based medium, favoured diacetyl production by this strain. The composition of the medium influenced the amount of diacetyl formed, since it was produced more in assays with added glucose. Similarly, diacetyl has been formed in some fermented foods that included starch and simple carbohydrates in the medium; the diacetyl concentration in dhokla was 2.03 mg l<sup>-1</sup> (Joshi *et al.* 1989), while in soy-based yoghurt, it was 80  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Granata and Morr 1996). In corn-based fermented foods as kenkey (Halm *et al.* 1993); pozol, sour-

porridge (Escamilla *et al.* 1996b), the presence of diacetyl was also detected by sensory analysis.

It was surprising that citrate was assimilated by *Ped. pentosaceus* MITJ-10; this compound was not significant for the production of diacetyl. Previous research carried out with milk and wine and other lactic acid bacteria concluded that citrate functions as an alternate source of pyruvate, leading to the biosynthesis of diacetyl (Shimazu *et al.* 1985; Cogan 1995; Cogain *et al.* 1996; Escamilla *et al.* 1996a). It is possible that free glucose could support the energy-related reactions since more lactic acid was produced when glucose was added to the systems; so, the slowly delivered starch by-products could become indirect sources of diacetyl. The yeast extract added to the growth medium (0.05–0.2%, w/v) significantly enhanced diacetyl production. Other factors that favoured the accumulation of diacetyl in the axenic cultures of *Ped. pentosaceus* MITJ-10 were the CaCO<sub>3</sub> (0.03%, w/v) acting as a pH buffer and a temperature of 28 °C.

The strain of *Ped. pentosaceus* MITJ-10 was able to consume starch in different cultivation conditions; however, the enzymatic assays carried out *in vitro*, either at 30 or 37 °C, revealed the absence of an extracellular amylase; this finding allows us to assume that the amylase might be linked to the cell. Among the pediococci, only *Ped. damnosus* (Garvie 1986) is recognized as a starch-utilizing species; nevertheless, strains of *Ped. pentosaceus* have occasionally been isolated from natural sources of a starchy nature (Halm *et al.* 1993; Merseburger *et al.* 1995; Olsen *et al.* 1995). Starch utilization by *Ped. pentosaceus* MITJ-10 was restrained by the addition of glucose (1%, w/v), probably due to catabolite repression.

In mixed culture, the viable counts were as high as those required in yoghurt (2 × 10<sup>6</sup> c.f.u. ml<sup>-1</sup>, SECOFI), in spite of the fact that starch-based media had lower nutritional values than milk. The best temperature for cell growth was 32 °C, indicating that *Ped. pentosaceus* MITJ-10 probably prevailed over *Lact. acidophilus* Hansen 1748, since the optimal growth temperatures were: 30–32 °C (Garvie 1986; Verde *et al.* 1995) and 35–40 °C (Kandler and Weiss 1986; Verde *et al.* 1995), respectively. The lowest growth in mixed culture was obtained at 35 °C, probably due to the inhibitory effect of acidity, as occurred in another strain of *Ped. pentosaceus* (Rodríguez and Manca-de-Nadra 1995). *Ped. pentosaceus* MITJ-10 is able to produce a pseudo-catalase (Verde *et al.* 1995) that protects it against the possible formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Lact. acidophilus* Hansen 1748 (Kandler and Weiss 1986; Verde *et al.* 1995). Therefore, this antagonistic effect did not occur in this system.

Both species are homofermenters, but *Lact. acidophilus* is particularly a flat-acid producer; therefore, most of the A.G.V. formed during the mixed cultures may be attributed to the metabolism of *Ped. pentosaceus* MITJ-10. The overall content of A.G.V. accumulated in the mixed culture carried out at 32 °C was 220.6 mg l<sup>-1</sup>, which is under the acceptable

levels of the butter-like aroma in starchy foods, as was indicated by Joshi *et al.* (1989) for dhokla ( $605.6 \text{ mg l}^{-1}$ ), or for some cheeses ( $9000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) added with butter milk (Joshi and Thakar 1993).

Highest diacetyl concentration ( $134.76 \text{ mg l}^{-1}$ ) was obtained at  $32^\circ\text{C}$ , in spite of the fact that other lactic acid bacteria have produced diacetyl at  $18\text{--}24^\circ\text{C}$  (Green and Manning 1982; Yadav and Srjnivasan 1985; Escamilla *et al.* 1996a). The mixed culture had a low final pH of 4.5. The content of diacetyl produced was considerably higher than that obtained in fermented dairy products ( $0.5\text{--}18 \text{ mg l}^{-1}$ ), but was within the range ( $100\text{--}300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) recommended for processed foods (Escamilla *et al.* 1996b).

It was concluded that the conditions recommended for diacetyl production by *Ped. pentosaceus* MFTJ-10 in axenic cultures are: glucose, 1% (w/v); yeast extract, 0.2% (w/v) and a temperature of  $28^\circ\text{C}$ . *Lact. acidophilus* Hansen 1748 in axenic culture consumed more starch at  $28^\circ\text{C}$  when 1% (w/v) glucose and 0.2% (w/v) yeast extract were added to the medium, but in the absence of citrate. The low pH values developed in some cultures exerted an inhibitory effect *in situ* upon the extracellular amylase of *Lact. acidophilus* Hansen 1748. A temperature of  $32^\circ\text{C}$  in mixed culture was the optimum for activities related to energy changes, i.e. consumption of reducing sugars, cell growth and production of lactic and acetic acids, and diacetyl. The highest production of diacetyl occurred in mixed cultures.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr Oscar Moroy for his generosity in allowing us to use his equipment, and M. Sc. Florina Ramirez for her advice during the GLC analysis.

#### REFERENCES

- Americine, M.A. and Ough, C.S. (1980) *Methods for Analysis of Must and Wines*, pp. 132–133. New York, NY: John Wiley and Sons Inc.
- AOAC (1980) *Official Methods of Analysis* 13th edn, pp. 268. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Barnett, A.J.G. (1951) The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochemistry Journal* **49**, 527–529.
- Champ, M., Szyllit, O., Raibaud, P. and Arzoumanian, N. (1983) Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 487–493.
- Cogan, T.M. (1995) Flavour production by dairy starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology Symposium (Suppl.)* **79**, 49c–44s.
- Cogan-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P. and Lindley, N.D. (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 253–267.
- Escamilla-Hurtado, M.L., Tomasini-Campocoso, A., Valdes-Martinez, S. and Soriano-Santos, J. (1996a) Diacetyl formation by lactic bacteria. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* **38**, 129–137.
- Escamilla-Hurtado, M.L., Tomasini-Campocoso, A., Valdes-Martinez, S. and Soriano-Santos, J. (1996b) Importancia del diacetilo en los aromas producidos por fermentación láctica. *Tecnología de Alimentos (Méx.)* **31**, 16–22.
- Garvie, E.I. (1986) Genus *Pediococcus* Claussen. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds Sneath, P.H.A., Mair, N.C., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. pp. 1075–1079. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Giraud, E., Gosselin, I., Marin, B., Parada, J.L. and Rainbault, M. (1993) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 276–282.
- Granata, L.A. and Morr, C.V. (1996) Improved acid, flavor and volatile compound production in a high protein and fiber soy milk yogurt-like product. *Journal of Food Science* **61**, 331–336.
- Green, M.L. and Manning, D.J. (1982) Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research* **49**, 737–748.
- Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K. and Jakobsen, M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenley production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 135–143.
- Inam, S.H., Burgess-Cassier, A., Cote, G.L., Gordon, S.H. and Baker, F.L. (1991) A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight  $\alpha$ -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Current Microbiology* **22**, 365–370.
- Joshi, N.S., Godbole, S.H. and Kamekar, P. (1989) Microbial and biochemical changes during Dhokla fermentation with special reference to flavour compounds. *Journal of Food Science and Technology* **26**, 113–115.
- Joshi, N.S. and Thakar, P.N. (1993) Utilization of butter milk in manufacture of buffalo milk cheddar cheese: changes during ripening. *Journal of Food Science and Technology* **30**, 172–175.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* eds Sneath, P.H.A., Mair, N.C., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. pp. 1209–1234. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Li, K. and Chan, K. (1983) Production and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 1380–1387.
- Margalith, P.Z. (1981) *Flavor Microbiology*, pp. 143–145. Springfield, IL: Charles Thomas Publications.
- Marshall, V.M. (1993) Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology* **46**, 49–56.
- McFaddin, J.F. (1980) *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria* 2nd edn, pp. 308–318. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Merschburger, T., Ehret, A., Geiges, O., Kammerer, D. and Schmidt-Lorenz, W. (1995) Microbiology of dough preparation. XI. Growth of lactic acid bacteria on wheat-meal-media. *Mittteilungen Aus Dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **86**, 286–303.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426–429.
- Olsen, A., Halm, M. and Jakobsen, M. (1995) The antimicrobial activity

## BIBLIOGRAFÍA

- of lactic acid bacteria from fermented maize (Kenkey) and their interactions during fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 506-512.
- Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. and Takano, M. (1995) Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from fermented fish and rice food, 'Burong Isda', and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 124-130.
- Rodríguez, A.V., Manca-d. and e-Nadra, M.C. (1995) Effect of pH and hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus hilgardii* on *Pediococcus pentosaceus* growth. *FEMS Microbiology Letters* 128, 59-62.
- Ross, P.J. (1989) *Toguchi Techniques for Quality Engineering*. Singapore: McGraw-Hill Book Co.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI). Dirección General de Normas (DGN) (1993) *Norma Oficial De Productos Preenvasados. Contenido Neto, Tolerancias Y Métodos De Verificación*. NOM-402-SCFI-1993. México, D.F.: SECOFI.
- Sen, S. and Chakraborty, S.L. (1984) Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *Journal of Fermentation Technology* 62, 407-413.
- Shimazu, Y., Uehara, M. and Watanabe, M. (1985) Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin, and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2147-2157.
- Vasavada, P.C. and White, C.R. (1979) Quality of commercial butter-milk. *Journal of Dairy Science* 62, 802-806.
- Verde-Calvo, J.R., Escamilla-Hurtado, M.L., Reyes-Durantes, A. and Malpica-Sánchez, F. (1995) Caracterización de bacterias lácticas con aplicaciones en vinos y sustratos amiláceos. *Proceedings of the VIII Workshop in Biotechnology* (Universidad Autónoma Metropolitana, México), pp. 5-10.
- White, C.A. and Kennedy, J.F. (1986) Oligosaccharides. In *Carbohydrate analysis. A Practical Approach* eds Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. pp. 37-38. Oxford: IRL Press Ltd.
- Yadav, J. and Srinivasan, A. (1985) Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* on the flavour of ghee (clarified butterfat). *Journal of Dairy Research* 52, 547-553.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adegoke, G.O. y Babalola, A.K.** 1988. Characteristics of micro-organisms of importance in the fermentation of fufu and ogi-Two Nigerian foods. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 449-453.
- Adegoke, G.O., Nwaigwe, R.N. y Oguntimein, G.B.** 1995. Microbiological and biochemical changes during the production of sekete - A fermented beverage made from maize. *J. Food Sci. Technol.* 32 (6): 516-518.
- Adeyemi, I.A. y Beckley, O.** 1986. Effect of period of maize fermentation and souring on chemical properties and amylograph pasting viscosity of ogi. *J. Cereal Sci.* 4: 353-360.
- Adeyemi, I.A.; Komolafe, A. y Akindele, A.O.** 1989. Properties of steam blanched maize flour as a constituent of weaning food. *J. Food Proc. Pres.* 13: 133-144.
- Akashi, K., Ikeda, H., Shibai, H., Kobayashi, K. Y Hirose, Y.** 1978. Determination of redox potential critical for respiration and suitable for L-leucine production. *Biotech. Bioeng.* 20: 27-41.
- Akingbala, J.O.; Onochie, E.U., Adeyemi, I.A. y Oguntimein, G.B.** 1987. Steeping of whole and dry milled maize kernels in ogi preparation. *J. Food Proc. Pres.* 11: 1-11.

- Akinrele, I.A.** 1970. Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *J. Food Agric.* 21: 619-625.
- Amerine, M.A. y Ough, C.S.** 1980. *Methods for analysis of mosts and wines.* John Wiley and Sons, Inc. N.Y., U.S.A. pp. 132-133.
- A.O.A.C.** 1980. *Official Methods of Analysis.* pp 268. 13<sup>a</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., U.S.A.
- Barber, S., Martínez-Anaya, M.A., Báguena, R. y Torres, M.J.** 1987. Microflora de la masa madre panaria. IV. Propiedades funcionales, en masas elaboradas con harina de trigo, de microorganismos puros-levaduras y lactobacilos-aislados de masas madre industriales. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 27 (1): 107-119.
- Barnett, A.J.G.** 1951. The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochem. J.* 49: 527-529.
- Bassit, N., Cochet, N. y Lebeault, J.M.** 1993. Influence of water activity on *Streptococcus diacetylactis* metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 399-401.
- Berg, R.W., Sandine, W.E. y Anderson, A.W.** 1981. Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Appl. Environ. Microbiol.* 786-788.
- Blickstad, E. y Molin, G.** 1981. Growth and lactic acid production of *Pediococcus pentosaceus* at different gas environments, temperatures, pH values and nitrite concentrations. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13: 170-174.

- Borch, E., Berg, H. y Holst, O.** 1991. Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 265-269.
- Bottazzi, V. y Vescovo, M.** 1969. Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. *Neth J. Dairy J.* 23: 84.
- Bressani, R.; Benavides, V.; Acevedo, E. y Ortiz, M.A.** 1990. Changes in selected nutrient contents and in protein quality. *Cereal Chem.* 67 (6): 515-518.
- Bucker, E.R.; Mitchell, H.H. y Johnson, M.G.** 1979. Lactic fermentation of peanut milk. *J. Food Sci.* 44:1534-1538.
- Cachon, R. y Diviès, C.** 1993. Kinetics of lactate fermentation and citrate bioconversion by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in batch culture. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 387-392.
- Carrillo-Pérez, E., Serna-Saldívar, S.O. y Rouzaud-Sandez, O.** 1989. Effect of storage conditions and packaging materials on the physicochemical, microbiological and sensory properties of corn dry masa flour. *J. Food Proc. Pres.* 13: 335-353.
- Champ, M.; Szylit, O., Raibaud, P. y Aït-Ardelkader, N.** 1983. Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 487-493.
- Choto, C.E.; Morad, M.M. y Rooney, L.W.** 1985. The quality of tortillas containing whole sorghum and pearled sorghum alone and blended with yellow maize. *Cereal Chem.* 62 (1): 51-55.

- Cocconcelli, P.S., Triban, E., Basso, M. y Botazzi, V.** 1991. Use of DNA probes in the study of silage colonization by *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 296-301.
- Cogan, T.M., Fitzgerald, R.J. y Doonan, S.** 1984. Acetolactate synthase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. *J. Dairy Res.* 51: 597-604.
- Cogan, J.F., Walsh, D. y Condon, S.** 1989. Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 77-84.
- Cogan, T.M.** 1995. Flavour production by dairy starter cultures. In *Microbial Fermentations: Beverages, Foods and Feeds*. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement ed. Board, R.G., Jones, D. y Jarvis, B. 79, 49S-64S. Oxford, Eng. UK: Blackwell Science Ltd.
- Cogain-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P. y Lindley, N.D.** 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70, 253-267.
- Coleman, A.A. y Ooraikul, B.** 1989. Characteristics of pure culture canola sauce fermentation. *J. Food Proc. and Preserv.* 13: 245-256.
- Cox, J.D. y Henick-Kling, T.** 1990. A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (3): 215-218.

- Dacremont, C. y Vickers, Z.** 1994. Concept matching technique for assessing importance of volatile compounds for cheddar cheese aroma. *J. Food Sci.* 59 (5): 981-985.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. y Fleet, G.H.** 1985. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (4): 290-301.
- Dziezak, J.D. (ed.).** 1986. Special Report. Biotechnology and flavor development. *Food Technol.* 39 (4):108-129.
- Escamilla-Hurtado, M.L. y Mozqueda-González, E.** 1992. Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnol. Aliment. (Méx.).* 27: 37-41.
- Escamilla-Hurtado, M.L., Pérez, B.; Olguín, P.; Arteaga, R.; González, O. y Escamilla-Hurtado, M.R.** 1992. Desarrollo de un alimento fermentado de maíz y su estudio de prefactibilidad. Mem. III Conferencia internacional sobre ciencia y tecnología de los alimentos. La Habana, Cuba. II: 11.40-11.42.
- Escamilla-Hurtado, Olguín-Lora, P. y Prado-Barragán, L.A.** 1993. Fermentación láctica en el atole agrio del grupo étnico tzotzil. *Rev. Esp. Cien. Tec. Aliment.* 33 (5): 555-564.
- Escamilla-Hurtado y Olguín-Lora, P.** 1997. Procedimiento de elaboración de un alimento fermentado de maíz y producto resultante. Tit. patente de invención No. 187205. IMPI. México.

- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosio, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J.** 1996a. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38 (2): 129-137.
- Escamilla Hurtado, M.L., Tomasini Campocosio, A., Valdés Martínez, S. y Soriano Santos, J.** 1996b. Importancia del diacetilo en los aromas producidos por fermentación láctica. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*. 31 (2): 16-22.
- Fennema, O.R.** 1982. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Vol. I. De Reverté, S.A. Barcelona, España. pp. 83-88.
- Fields, M.L., Hamad, A.M. y Smith, D.K.** 1981. Natural lactic acid fermentation of corn meal. *J. Food Sci.* 46: 900-902.
- Forss, D.A.** 1979. Review of the progress of dairy science: Mechanisms of formation of aroma compounds in milk products. *J. Dairy Res.* 46: 691-706.
- Furia, T.E. y Bellaca, N.** 1975. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 2nd. Ed. 2. C.R.C. Press. Cleveland, Ohio, U.S.A.
- Garvie, E.I.** 1986. Genus *Pediococcus*. Claussen. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Section 12 (*Gram-positive cocci*) ed. Snead, P.H.A., Mair, N.C., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. Vol. 2, pp. 1075-1079. Baltimore, USA: William and Wilkins.
- Giraud, E., Champailler, A. y Raimbault, M.** 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (12): 4319-4323.

- Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J.L. y Rimbault, M.** 1993. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain. A. 6. J. Appl. Bacteriol. 75: 276-282.
- González, C.F. y Kunka, B.S.** 1986. Evidence for plasmid linkage of raffinose utilization and associated  $\alpha$ -galactosidase and sucrose hydrolase activity in *Pediococcus pentosaceus*. Appl. Environ. Microbiol. 51:105-109.
- Granata, L.A. y Morr, C.V.** 1996. Improved acid, flavor and volatile compound production in a high protein and fiber soymilk yogurt - like product. J. Food Sci. 61 (2): 331-336.
- Green, M.L. y Manning, D.J.** 1982. Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. J. Dairy Res. 49: 737-748.
- Hamad, A.M. y Fields, M.L.** 1979. Evaluation of the protein quality and available lysine of germinated and fermented cereals. J. Food Sci. 44: 456-459.
- Harvey, R.J. y Collins, E.B.** 1963. Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetilactis*. J. Bacteriol. 86: 1301.
- Hippleheuser, A.** 1995. Aplicaciones de alimentos especializados en almidones encapsulantes de grasas, aceites y sabores. Conferencia en EXPOTECNOALIMENTARIA 95. ATAM. México, D.F. y Folleto informativo American Maize Products Co. Indianapolis, Ind., U.S.A.
- Hofman, C. J. y Marshall, W.E.** 1985. Lactic fermentation of ground soybean for use in imitation cream cheese products. J. Food Sci. 50: 325-329.

**Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. y Rombouts, F.M.**

1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 279-287.

**Huang, C.J. y Zayas, J.F.** 1996. Aroma characteristics of corn germ protein flours. *J.*

*Food Sci.* 61 (1): 258-261.

**Imam, S.H., Burgess - Cassier, A., Cote, G.L., Gordon, S.H. y Baker, F.L.** 1991. A

study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight  $\alpha$ -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Curr. Microbiol.* 22: 365-370.

**Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). S.P.P.** 1986.

La industria química en México. Aguascalientes, Ags. México.

**Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). S.P.P.** 1999.

Indicadores del sector alimentario. Producción Nacional de cultivos básicos, año agrícola 1997-98. México.

[http://www.inegi.gob.mx/economia/espanol/biosa//bio\\_03.html](http://www.inegi.gob.mx/economia/espanol/biosa//bio_03.html).

**Ishizaki, A., Shibai, H. y Hirose, Y.** 1974. Basic aspects of electrode potential

change in submerged fermentation. *Agr. Biol. Chem.* 38 (2): 2399-2406.

**James, J.A., Berger, J.L. y Lee, B.H.** 1997. Purification of glucoamylase from

*Lactobacillus amylovorus* ATCC 3321. *Current Microbiol.* 34: 186-191.

**Joshi, N., Godbole, S.H. y Kanekar, P.** 1989. Microbial and biochemical changes

during Dhokla fermentation with special reference to flavour compounds. *J*

*Food. Sci. Technol.* 26 (2): 113-115.

- Joshi, N. y Thakar, P.N.** 1993. Utilization of butter milk in manufacture of buffalo milk cheddar cheese: changes during ripening. *J. Food Sci. Technol.* 30 (3): 172-175.
- Kanbe, C. y Uchida, K.** 1987. Citrate metabolism by *Pediococcus halophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1257-1262.
- Kandler, O. y Weiss, N.** 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Section 14 (Regular, Nonsporing, Gram-positive rods) ed. Sned, P.H.A., Mair, N.C., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. Vol. 2, pp. 1209-1234. Baltimore, USA: William and Wilkins.
- Kaneko, T., Takahashi, M. y Suzuki, H.** 1990. Acetoin fermentation by citrate positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or  $\text{Cu}^{2+}$ . *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (9): 2644-2649.
- Keenan, T.W., Lindsay, R.C., Morgan, M.E. y Day, E.A.** 1966. Acetaldehyde production by single- strain lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.* 49: 10-14.
- Kempler, G.M.** 1983. Production of flavor compounds by microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 29: 42-45.
- Klaver, F.A.M.; Kingma, F.; Martin, J., Timmer, J.M.K. y Weerkamp, A.H.** 1992. Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermenter: buttermilk. *Neth. Milk Dairy J.* 46: 19-30.
- Kunkee, R.E.** 1967. Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol. Viticult.* 18: 71-77.

- Laye, I., Karleskind, D. y Morr, C.V.** 1993. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. *J. Food Sci.* 58 (5): 991-995.
- Less, R.** 1984. Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 129.
- Li, K.B. y Chan, K.Y.** 1983. Production and properties of  $\alpha$ -glucosidase of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (6): 1380-1387.
- Lindsay, R.C.** 1966. Chemistry and physiology of flavors. H.W., Schulttz, E A. Day y M. Libbey (eds.): 315. Avi. Publ. Westport, Conn., U.S.A.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. y Tzanetakis, N.** 1989. Biotechnologically important metabolic activities of *Pediococcus* isolates from milk and cheese. *Microb. Alim. Nut.* 7(2): 113-122.
- López Munguía, A. y Segurajaúregui J.** 1986. Efecto de la variedad del maíz en la cinética de nixtamalización. *Tecnol. Aliment. (Méx.)* 21 (5): 13-19.
- Louaileche, H., Bracquart, P., Saulnier, F., Desmazeaud, M. y Linden, G.** 1993. Carbon dioxide effects on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 76 (12): 3683-3689.
- Mangas, J.J.; Moreno, J.; Cabranes, C.; Dapena, E. y Blanco, D.** 1993. Contribución al estudio de la sidra parcialmente dulce. *Alimentaria* 243: 85-89.
- Margalith, P.Z.** 1981. Flavor microbiology. Charles Thomas Pub. Springfield, Illinois, U.S.A. pp. 37-60, 143-145.

- Marousis, S.N.; Karathanos, V.T. y Saravacos, G.D.** 1991. Effect of physical structure of starch materials on water diffusivity. *J. Food Proc. Pres.* 15: 183-195.
- Martins, J.F.P., Mori, E.E.M., Figueiredo, I.B. y Fernandes, J.** 1979. Ripening of Prato cheese: effect of adding pediococci on the speed of ripening. *Colet. Inst. Technol. Aliment.* 10: 141-154 (En: *Dairy Sci. Abs.* (1981) 3736).
- Marshall, V.M.** 1987. Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. *J. Dairy Res.* 54: 559-574.
- Marshall, V.M.** 1993. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J. Soc. Dairy Tech.* 46 (2): 49-93.
- McFaddin, J.F.** 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Md. U.S.A. pp. 308-320, 354.
- McGregor, J.U. y White, C.H.** 1987. Effect of sweeteners on major volatile compounds and flavor of yogurt. *J. Dairy Sci.* 70: 1828-1834.
- Mehari, T. y Ashenafi, M.** 1995. Microbiology of siljo, a traditional Ethiopian fermented legume product. *World J. Microbio. Biotechnol.* 11: 338-342.
- Mellerick, D. y Cogan, T.M.** 1981. Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 48: 497-502.
- Merseburger, T. Ehret, A., Geiges, O., Kammerer, D. y Schmidt - Lorenz, W.** 1995. Microbiology of dough preparation. VI. Growth of lactic acid bacteria on wheat - meal - media. *Mitt. Geb. Leben. Hyg.* 86 (3), 286-303.

- Mercier, P., Yerushalmi, L., Rouleau, D. y Dochain, D.** 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 55: 111-121.
- Merory, J.** 1968. Food flavorings. Composition, manufacture and use. The AVI Pub. Co. Inc. Westport, Conn., U.S.A.
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem. 31: 426-429.
- Mital, B.K. y Steinkraus, K.H.** 1976. Flavor acceptability of unfermented and lactic-fermented soy milks. J. Milk Food Technol. 39 (5): 342-344.
- Nahaisi, M.H.** 1986. *Lactobacillus acidophilus*: Therapeutic properties, products, and enumeration. En Developments in Food Microbiology - 2. Developments Series. R.K. Robinson (Ed). Elsevier Appl. Sci. Pub. Ltd. London, Great Britain. U.K. pp. 171, 174.
- Nsofor, L.M., Nsofor, O.N. y Nwachukwu, K.E.** 1992. Soya-yoghurt starter culture development from fermented tropical vegetables. J. Sci. Food Agric. 60: 515-518.
- Ofuya, C.O. y Nnajiolor, C.** 1989. Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. J. Appl. Bacteriol. 66: 37-42.
- Olguin, P., Mozqueda, E., Gallardo, F. y Escamilla, L.** 1988. Analisis sensorial de pozol y del atole de maiz agrio. Res. Trabajos libres. XVIII Cong. Nac. Cien. Tecnol. Aliment. ATAM. Tec. Aliment. (Méx.). 23 (4): 26.

- Olsen, A., Halm, M. y Jakobsen, M.** 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 506-512.
- Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. y Takano, M.** 1995. Characterization of starch - hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from fermented fish and rice food, "Burong Isda", and its amyolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (2): 124-130.
- Oyeyiola, G.P.** 1991. Fermentation of millet to produce Kamu - A Nigerian starch - cake food. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7 (2): 196-201
- Patel, A.A.; Waghmare, W.M. y Gupta, S.K.** 1980. Lactic fermentation of soymilk. A review. *Proc. Biochem.* 15 (5): 9-13.
- Parés I. Farràs, R. y Juárez Giménez, A.** *Bioquímica de los microorganismos.* Ed. REVERTE S.A. Barcelona, España.1997.
- Pederson, C.S.** 1979. *Microbiology of Food Fermentations.* The AVI Pub. Co., Inc. Westport, Conn., U.S.A. pp. 90-91.
- Pirt, S.J.** 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation.* Blackwell Sci. Pub. London, England. U.K. pp. 4-6, 156-160.
- Pompeyo, C.C., Gómez, M.S., Gasparian, S. y Morlon-Guyot, J.** 1993. Comparison of amyolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 266-269.
- Porres, E., Arriola, M.C., García, R. y Rolz, C.** 1985. Lactic acid fermentation of banana puree. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 18 (6): 379-382.

- Pszczola, D.E. (ed.).** 1994. Product update. New ingredients and applications. Food Tech. 48 (1): 114-128.
- Rodríguez, A.V. y Manca de Nadra, M.C.** 1994. Sugar and organic acid metabolism in mixed cultures of *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc oenos* isolated from wine. J. Appl. Bacteriol. 77:61-66.
- Rodríguez, A.V. y Manca de Nadra, M.C.** 1995a. Effect of pH and hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus hilgardii* on *Pediococcus pentosaceus* growth. FEMS Microbiol. Let. 128: 59-62.
- Rodríguez, A.V. y Manca de Nadra, M.C.** 1995b. Short communication: Interaction between *Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus* and their metabolism of sugars and organic acids. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 349-350.
- Ross, P.J.** 1989. Taguchi techniques for quality engineering. McGraw-Hill Book Co. Singapore.
- Sanders, M.E., Wasserman, B. y Foegeding, A.** 1993. Research needs in biotechnology. Special report. Food Technol. Supplement. 47 (3): 18 S - 21.S.
- Sandine, W.E., Daly, C., Elliker, P.R. y Vedamuthu, E.R.** 1972. Causes and control of culture-related flavor defects in cultured dairy products. J. Dairy Sci. 55: 1031.
- SANOFI Bio-Industries, Inc.-Div. Cultures and Enzymes.** 1994. Catálogo de ingredientes lácteos enzimáticamente modificados. Waukesha, Wi. U.S.A.

- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI). Dirección General de Normas (DGN).** 1993. Norma oficial de productos preenvasados. Contenido neto, tolerancias y métodos de verificación. NOM-002-SCFI-1993. Diario Oficial del 13/10/93. México.
- Sen, S. y Chakrabarty, S.L.** 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. J. Ferment. Technol. 62 (5): 407-413.
- Shimazu, Y., Uehara, M. y Watanabe, M.** 1985. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. Agric. Biol. Chem. 49 (7): 2147-2157.
- Shirle-Keller, J.P., Reineccius, G.A. y Hatchwell, L.C.** 1994. Flavor interactions with fat replacers: effect of oil level. J. Food Sci. 59 (4): 813-815, 875.
- Silva Villarreal, L.C., Escamilla Hurtado, M.L. y Cadena Roa, M.A.** 1991. Optimización de las condiciones de fermentación en la elaboración tradicional del pozol. Tesis Lic. en Ciencia de los Alimentos. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chis. México. pp. 11-16, 24-35.
- Smith, B.L.** 1990. Codex Alimentarius. Abridged Version. F.A.O. and WHO. Roma, Italia. P. 3.43.
- Strasser-de-Saad, A.M. y Manca-de-Nadra, M.C.** 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. J. Appl. Bacteriol. 74: 406-410.

- Tamime, A.Y. y Deeth, H.C.** 1980. Yoghurt: Technology and biochemistry. *J. Food Prot.* 43 (12): 939-977.
- Tetlow, A.L. y Hoover, D.G.** 1988. Fermentation products from carbohydrate metabolism in *Pediococcus pentosaceus* PC39. *J. Food Prot.* 51 (10): 804-806.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Vafopoulou-Mastrojiannaki, A.** 1991. Effect of *Pediococcus pentosaceus* on microbiology and chemistry of Teleme cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24: 173-176.
- Vasavada, P.C. y White, C.H.** 1979. Our industry today. Quality of commercial buttermilk. *J. Dairy Sci.* 62: 802-806.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N.** 1990. Effect of *Pediococcus pentosaceus* on ripening changes of Feta cheese. *Microbiol. Alimen. Nutr.* 8: 53-62.
- Verde Calvo J. R., Escamilla Hurtado M. L., Reyes Dorantes A. y Malpica Sánchez, F.** 1995. Caracterización de bacterias lácticas con aplicaciones en vinos y sustratos amiláceos. Res. Ext. VIII Jornada de Biotecnología. Depto. Biotec. U. Autónoma Metropolitana. México, D.F. México. pp. 5-10.
- Wacher, C., Cañas, A., Cook, P.E., Bárzana, E. y Owens, J.D.** 1993. Sources of microorganisms in *pozol*, a traditional Mexican fermented maize dough. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 269-274.

- White, C.A. y Kennedy, J.F.** 1986. Oligosaccharides. En Carbohydrate analysis. A practical approach. Ed. Chaplin, M.F. y Kennedy, J.F. I.R.L. Press Ltd. Oxford, England, G.B. pp. 37-38.
- Watson, A., Stephen, J. y Smith, A.M.** 1984. El ensilaje. C.E.C.S.A. México, D.F. p.135.
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C.R.; Fleet, G.H. y Lee, T.H.** 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (4): 302-313.
- Yadav, J. y Srinivasan, A.** 1985. Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* diacetylactis on the flavour of ghee (clarified butterfat). *J. Dairy Res.* 52: 547-553.