

EVALUACIÓN DE SEDIMENTOS DE PULQUE (*XAXTLE*) COMO CULTIVO INICIADOR PARA OBTENER UN PRODUCTO DE PANIFICACIÓN DE BAJO ÍNDICE GLUCÉMICO

EVALUATION OF PULQUE SEDIMENT (*XAXTLE*) AS A STARTER CULTURE IN ORDER TO OBTAIN A LOW GLYCEMIC INDEX BAKED PRODUCT

Edgar Torres-Maravilla¹, J. Alejandra Blancas-Nápoles¹, P. Alberto Vázquez-Landaverde²,
Eliseo Cristiani-Urbina¹, Lino Mayorga-Reyes³, M. Elena Sánchez-Pardo¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Plan de Ayala y Carpio, Colonia Casco Santo Tomás. 11340. Delegación Miguel Hidalgo, México D. F. (alimentoselena@hotmail.com), (msanchezp@ipn.com.mx). ²Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Unidad Querétaro, Cerro Blanco 141, Colonia Colinas del Cimatario, 76090. Querétaro, México. (pedrovl70@hotmail.com). ³Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, 04960. Delegación Coyoacán, México D. F. (lmayorga@correio.xoc.uam.mx).

RESUMEN

El pan de pulque es un alimento tradicional mexicano que resulta de la fermentación por bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el pulque o en sus sedimentos *xaxtle*. El objetivo de este estudio fue evaluar el *xaxtle* como cultivo iniciador en la fermentación de masas para panificación con el objetivo de obtener pan con índice glucémico bajo. Mediante pruebas fenotípicas y genotípicas se identificaron bacterias del género *Lactobacillus* y levaduras del género *Saccharomyces*, como microorganismos predominantes en el *xaxtle*. La metodología de superficie de respuesta se usó para obtener la cantidad óptima de *xaxtle* liofilizado, 3 g ($\sim 10^8$ UFC·g⁻¹) y el tiempo óptimo (90 min) de fermentación de la masa, considerando el valor D-óptimo del software Design Expert. La microestructura de la miga del pan fermentado con *xaxtle* mostró hidrólisis parcial de la matriz proteínica, conformada por gliadinas y gluteninas. Además, el contenido de almidón total y almidón disponible del pan con *xaxtle* disminuyó 9.8 % con respecto al pan elaborado con *S. cerevisiae* (p=0.03) y el almidón resistente fue similar en ambos productos (p=0.073). La fermentación con *xaxtle* redujo el contenido de almidón hidrolizado en el pan aproximadamente 4 %, clasificándose como un pan de índice glucémico bajo. Por lo tanto, el uso de *xaxtle* como cultivo iniciador en la fermentación de masas para panificación, favoreció la reducción del índice glucémico debido a la acción de los microorganismos presentes en el mismo.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2014. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 183-200. 2016.

ABSTRACT

Pulque bread is a traditional Mexican product that results from the fermentation by lactic acid bacteria (LAB) present in pulque or in its sediments (*xaxtle*). The objective of this study was to evaluate *xaxtle* as a starter culture in the fermentation of bread dough in order to obtain a low glycemic index baked product. Phenotypic and genotypic tests are used to identify bacteria of the genus *Lactobacillus* and yeasts of the genus of *Saccharomyces* as predominant organisms in *xaxtle*. Surface response methodology was used to obtain the optimum amount of lyophilized *xaxtle*, 3 g ($\sim 10^8$ UFC·g⁻¹) and the optimum time (90 min) of fermentation of the dough, considering the value D-optimum of the software DesignExpert. The microstructure of the bread dough fermented with *xaxtle* showed a partial hydrolysis of the protein matrix, conformed by gliadins and glutenins. Furthermore, the total starch content and available starch of the bread with *xaxtle* decreased by 9.8 % with respect to the bread made with *S. cerevisiae* (p=0.03) and the resistant starch was similar in both products (p=0.073). Fermentation with *xaxtle* reduced the hydrolyzed starch content in bread by approximately 4 %, thus classifying the product as low glycemic index bread. Therefore, the use of *xaxtle* as a starter culture in the fermentation of bread dough favored the reduction of the glycemic index due to the action of the microorganisms present.

Key words: *Lactobacillus*, yeasts, bread, glycemic index.

Palabras clave: *Lactobacillus*, levaduras, panificación, índice glucémico.

INTRODUCCIÓN

En México existen productos fermentados artesanales que contienen diversos grupos microbianos como el pulque, una bebida tradicional fermentada (Escalante *et al.* 2004, 2008; Lappe *et al.* 2008; Torres *et al.* 2014). Además, Torres-Maravilla *et al.* (2015), identificaron y caracterizaron bacterias del género *Lactobacillus* del *xaxtle*, con propiedades probióticas. El *xaxtle* son los sedimentos acumulados durante la fermentación del pulque y se usan como sustitutos parciales de la levadura y del agua en la panificación artesanal en México (Barros y Buenrostro, 2004). Según Escalante *et al.* (2004), las bacterias ácido lácticas (BAL) son uno de los géneros de microorganismos más representativos en el pulque; sin embargo, aún no hay datos del efecto del pulque o *xaxtle*, o ambos, como cultivo iniciador para la fermentación de masas para pan. La tecnología *sourdough* (masas agrias) es el uso de las BAL en la fermentación de masas para panificación y es una práctica común para elaborar: Panettone, Pandoro y Colomba de Italia (Corsetti y Settanni, 2007; Sanz-Penella *et al.* 2012); el pan tipo francés de San Francisco (EE.UU.) y galletas acidificadas químicamente en EE.UU. (Arendt *et al.* 2007).

Liljeberg *et al.* (1996) indicaron que los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos de las masas fermentadas retrasan el vaciado gástrico y reducen el índice glucémico. Además, en productos de panificación fermentados con *sourdough* (tiempos de fermentación 6 a 10 h), la concentración de almidón resistente y de ácido láctico aumentaron, mientras que la concentración del almidón disponible y el índice glucémico disminuyeron (Scazzina *et al.* 2009). El uso del *xaxtle* como cultivo iniciador en la fermentación de masas podría ser integrado a la tecnología *sourdough* para elaborar pan, debido a los efectos benéficos de las BAL y las levaduras presentes en el mismo, según Torres-Maravilla *et al.* (2015). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los sedimentos de pulque *xaxtle* como cultivo iniciador para obtener pan de bajo índice glucémico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

En la región de Huiloapan, Tlaxcala, México, se recolectaron 10 L de *xaxtle* en marzo y abril del 2013. Las muestras

INTRODUCTION

In Mexico there are artisanally fermented products such as pulque, a traditional drink, which contain diverse microbial groups (Escalante *et al.*, 2004, 2008; Lappe *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2014). Furthermore, Torres-Maravilla *et al.* (2015) identified and characterized bacteria of the genus *Lactobacillus* in *xaxtle* with probiotic properties. *Xaxtle* consists of the sediments accumulated during fermentation of the pulque and is used as a partial substitute for the yeast and water in artisanal bread-making in Mexico (Barros and Buenrostro, 2004). According to Escalante *et al.* (2004), lactic acid bacteria (LAB) are one of the most representative microorganism genera present in pulque. However, there is no data with respect to the effect of pulque or *xaxtle*, or a combination of both as a starter culture for the fermentation of bread dough. Sourdough technology is the use of the LABs in the fermentation of bread dough, which is a common practice for making Panettone, Pandoro and Colomba of Italy (Corsetti and Settanni, 2007; Sanz-Penella *et al.*, 2012); the type of French bread made in San Francisco (U.S.A.) and chemically acidified cookies in the U.S.A. (Arendt *et al.*, 2007).

Liljeberg *et al.* (1996) indicated that the organic acids produced by the microorganisms of the fermented dough delay the gastric emptying process and reduce the glycemic index. Furthermore, in baked products fermented with sourdough (at fermentation times between 6 and 10 h), the concentration of resistant starch and lactic acid increased, whereas the concentration of available starch and the glycemic index decreased (Scazzina *et al.*, 2009). The use of *xaxtle* as a starter culture in dough fermentation could be integrated to the sourdough technology for breadmaking, due to the beneficial effects of the LABs and yeasts present, according to Torres-Maravilla *et al.* (2015). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of pulque sediments or *xaxtle* as a starter culture for obtaining low glycemic index baked products.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

In the region of Huiloapan, Tlaxcala, Mexico, 10 L of *xaxtle* were collected in March and April of 2013. The samples were placed in sterile jars and maintained between 4 and 7 °C during

fueron colocadas en frascos estériles y se mantuvieron entre 4 a 7 °C durante su traslado al laboratorio (-6 h) para ser liofilizadas (Freezer-dryer SMH-50, Usifroid, Maurepas, Francia). El recuento de células se realizó antes de elaborar cada lote de panificación para verificar el número de células viables, usando una cámara de Neubauer mediante tinción por exclusión del colorante azul de tripano (0.4 %), que permite diferenciar células vivas de muertas (Baena *et al.* 2006).

Caracterización fisicoquímica del *xaxtle*

Las características fisicoquímicas fueron evaluadas en el *xaxtle* fresco antes de su liofilización. El contenido de humedad se realizó por el método de presión reducida (Método 44-15.02); cenizas totales por el método de calcinación (08-03.01); proteína total por Kjeldahl (46-13.01); todos, métodos oficiales de la AACC (2001). Los valores de pH fueron evaluados con un potenciómetro (Denver Instrument pH meter AP5, Westminster, California, EE.UU.), y el contenido de azúcares reductores se determinó de acuerdo al manual ICUMSA (1964).

Aislamiento

Para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), el aislamiento de las BAL y de las levaduras, se usaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} desde 10 g de *xaxtle* liofilizado (gX_L) en solución reguladora de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). Para las BAL se usó el agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco) y para las levaduras se empleó agar papa dextrosa (PDA, Difco) y agar dextrosa Sabouraud (DS, Difco), las placas fueron incubadas 48 h a 37 °C. El aislamiento se realizó mediante pases sucesivos en los mismos medios de cultivo. Las colonias presuntivas se seleccionaron mediante tinción Gram y la prueba de catalasa para las bacterias ácido lácticas y con tinción verde de malaquita para las levaduras.

Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias aisladas del *xaxtle*

Para esta identificación se usó un perfil de fermentación de carbohidratos con tiras API 50 CHL (bioMérieux, Francia). La biomasa de las bacterias aisladas se obtuvo de 2 mL de un cultivo de 12 h en caldo MRS (Difco), el cual se usó para extraer su ADN (Martín *et al.*, 2007). Para extraer ADN de las levaduras, la biomasa se cosechó desde las placas con agar usando el método fenol-cloroformo (Blin y Stafford, 1976).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó para la amplificación del gen 16S ARNr de las bacterias presentes en el *xaxtle*, utilizando los siguientes iniciadores: forward (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'), posición equivalente 9-28 en

their transport to the laboratory (-6 h) to be lyophilized (Freezer-dryer SMH-50, Usifroid, Maurepas, France). The cell count was made before making each baking lot to verify the number of viable cells, using a Neubauer camera with staining for exclusion of the blue tripano stain (0.4 %), in order to differentiate live cells from dead cells (Baena *et al.*, 2006).

Phytochemical characterization of *xaxtle*

The phytochemical characteristics were evaluated in fresh *xaxtle* prior to its lyophilization. The moisture content was measured using the reduced pressure method (Method 44-15.02); total ash by the calcinations method (08-03.01); total protein by Kjeldahl (46-13.01); all of which are official methods of the AACC (2001). The values of pH were evaluated with a potentiometer (Denver Instrument pH meter AP5, Westminster, California, U.S.), and the reductive sugar content was determined according to the ICUMMSA manual (1964).

Isolation

For the count of colony forming units (CFU), the isolation of the LABs and of the yeasts, serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-6} were used from 10 g of lyophilized *xaxtle* (gX_L) in a phosphate regulating solution 0.1 M (pH 7.4). For the LABs, Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS, Difco) was used, and for the yeasts, potato dextrose agar (PDA, Difco) and Sabouraud dextrose agar (DS, Difco). The plates were incubated 48 h at 37 °C. The isolation was made with successive steps in the same culture media. The presumptive colonies were selected using Gram stain, and the catalase test for the case of the lactic acid bacteria, while malachite green stain was used for the yeasts.

Phenotypic and genotypic identification of the bacteria isolated from the *xaxtle*

A carbohydrate fermentation profile was used for the identification with API-50 CHL strips (bioMérieux, France). The biomass of the isolated bacteria was obtained from 2 mL of a culture of 12 h in MRS broth (Difco), which was used for the extraction of its DNA (Martín *et al.*, 2007). For the DNA extraction of the yeasts, the biomass was directly harvested from the plates with agar using the phenol-chloroform method (Blin and Stafford, 1976).

The polymerase chain reaction (PCR) was carried out for the amplification of the gene 16S RNAr of the bacteria present in the *xaxtle*, using the following indicators: forward (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') equivalent position 9-28 in *Escherichia coli* 16S RNAr) and reverse (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'),

Escherichia coli 16S ARNr) y reverse (5'GTTGCGCTCGTT-GCGGGACT-3'), posición 1109-1090 en *E. coli* 16S ARNr) (Ramírez-Chavarrín *et al.*, 2010). La reacción de PCR fue realizada con la siguiente mezcla de reactivos: amortiguador 1X PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂ pH 8.0; 200 mM de cada dNTP; *Taq* polimerasa (1.5U·mL⁻¹); 20 pmol de oligos, 10 ng mL⁻¹ de ADN molde; y se agregó agua destilada a la mezcla hasta obtener 50 µL. El protocolo tuvo una fase inicial de desnaturalización (94 °C por 3 min), seguida por 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación del iniciador a 65 °C por 90 s, y alargamiento a 72 °C por 2 min, además de 15 min adicionales para finalizar el ciclo de reacción. Para identificar levaduras se usó el par de iniciadores universales ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') hasta LR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC-3') (Fell *et al.* 2000; Sampaio y Gonçalves, 2008) bajo condiciones convencionales de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador BiometraTGradient (Whatman, Biometra, Göttingen, Alemania). Los productos de amplificación de ADN se corroboraron en una electroforesis (0.8 % de agarosa) y se visualizaron por fluorescencia ultravioleta después de ser teñidos con bromuro de etidio. La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit QIAGEN gen cleanup y fueron secuenciados con Applied Biosystems (ABI) Prism 3100 Genetic Analyzer (Vernon Hills, Illinois, EE.UU.). Las homologías se realizaron en la base de nucleótidos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, EE.UU.).

Proceso de panificación

Un pan modelo se elaboró para todos los análisis con: 300 g de harina de trigo comercial; 3.6 g de NaCl; 24 g de leche entera en polvo; 60 g de huevo fresco; 16 g de materia grasa y 100 mL de agua destilada estéril. El contenido de *xaxtle* se agregó de acuerdo con el diseño de metodología de superficie de respuesta (MSR). Para el pan testigo se empleó levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*). Los ingredientes se mezclaron 10 min en una batidora (Kitchen-Aid Heavy-Duty, Model K5SS, EE.UU.); la masa se incubó a 37 °C con el tiempo indicado en el diseño experimental. Después la masa se dividió en porciones de 60 g y se fermentó 30 min a 37 °C; y para obtener el pan, las masas fueron horneadas 30 min a 180 °C en un horno de columpios (Henry Simon Limited, Cheshire, R.U.).

El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de BAL y de levaduras en la masa óptima (metodología de superficie de respuesta) se efectuó de acuerdo con lo descrito en la sección anterior. El pH y la acidez titulable total (ATT) fueron

posición 1109-1090 in *E. coli* 16S RNAr) (Ramírez-Chavarrín *et al.*, 2010). The PCR reaction was made with the following mixture of reagents: buffer 1X PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂ pH 8.0; 200 mM of each dNTP; *Taq* polymerase (1.5U·mL⁻¹); 20 pmol of oligos, 10 ng mL⁻¹ of mold DNA; and distilled water was added to the mixture until 50 µL was obtained. The protocol consisted of an initial denaturalization phase at 94 °C for 1 min, alignment of the starter at 65 °C for 90 s, and lengthening at 72 °C for 2 min, as well as 15 additional min to finalize the reaction cycle. For yeast identification, we used the pair of universal starters ITS 5(5'-GGAAGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') to LR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC-3') (Fell *et al.*, 2000; Sampaio and Gonçalves, 2008) under conventional conditions of PCR.

The reactions of PCR were carried out in BiometraTGradient thermocycler (Whatman, Biometra, Göttingen, Germany). The amplification products of DNA were confirmed in electrophoresis (0.8 % agarose) and were visualized through ultraviolet fluorescence after being stained with ethidium bromide. The purification of the PCR products was made with the QIAGEN gene cleanup kit and sequenced with the Applied Biosystems (ABI) Prism 3100 Genetic Analyzer (Vernon Hills, Illinois, U.S.). The homologies were made in the nucleotides base BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) of the NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, U.S.A.).

Baking process

A bread model was made for all of the analyses with the following: 300 g of commercial wheat flour; 3.6 g of NaCl; 24 g of powdered whole milk; 60 g of fresh eggs; 16 g of fatty matter and 100 mL of sterile distilled water. The *xaxtle* content was added according to the design of surface response methodology (SRM). For the control bread, commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was used. The ingredients were mixed for 10 min in a mixer (Kitchen-Aid Heavy-Duty, Model K5SS, U.S.A.); the dough was incubated at 37 °C with the time indicated in the experimental design. Next, the dough was divided in portions of 60 g and was fermented 30 min at 37 °C; and to obtain the bread, the doughs were baked 30 min at 180 °C in a swing oven (Henry Simon Limited, Cheshire, U.K.).

The count of colony forming units (CFU) of LAB and yeasts in the optimum dough (surface response methodology) was carried out according to what was described in the previous section. The pH and total titratable acidity (TTA) were determined in the optimum doughs, 10 g of dough were homogenized in 90 mL of distilled water; pH was registered with a potentiometer (AP5, Denver instrument, U.S.A.). The TTA

determinados en las masas óptimas, 10 g de masa fueron homogenizadas en 90 mL de agua destilada, el pH fue registrado con un potenciómetro (AP5, Denver instrument EE.UU.). La APT fue valorada utilizando NaOH 0.1 N hasta llegar a un pH final de 8.5, y se expresó en mL de NaOH 0.1 N necesarios para titular 10 g de masa (Sanz-Penella *et al.* 2012).

Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La MSR se utilizó para determinar las condiciones óptimas de cantidad de *xaxtle* liofilizado (gX_L) y tiempo de fermentación (min) para la elaboración del pan. En esta investigación se usaron dos variables: la cantidad de *xaxtle* liofilizado (0 a 10 g de *xaxtle* por 100 g de harina de trigo) y el tiempo de fermentación (30 a 90 min) (Cuadro 1).

Los límites superiores e inferiores se obtuvieron de estudios preliminares. El diseño y el análisis de la MSR se realizaron con el programa DesignExpert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.). El programa se basó en 13 experimentos con cinco repeticiones del punto central, cuatro puntos factoriales y cuatro puntos axiales. Las variables de respuesta fueron: volumen específico (VE) del pan con *xaxtle*; textura (Tx) de la corteza y luminosidad (L) de la miga. La significancia de los modelos (VE, Tx, L) se realizó con un ANDEVA para identificar el coeficiente de correlación (r) de cada respuesta. Además se usó la herramienta de optimización D-óptima del DesignExpert para obtener los gramos de *xaxtle* liofilizado y tiempo de fermentación para la elaboración de pan. El valor de la D-óptima es el resultado de la combinación de tres ecuaciones de superficie de respuesta (volumen específico, textura y luminosidad).

Volumen específico (VE)

El volumen específico del pan se obtuvo mediante el desplazamiento de semilla de nabo, de acuerdo con el método oficial (10-05.01) de la AACC (2001) y con la fórmula:

$$\text{Volumen específico (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} = \text{Volumen del pan (cm}^3\text{)} \times \text{peso del pan (g)}$$

Textura (Tx)

La textura se evaluó con un penetrómetro Modelo 327 PressureTester (EFFEGI, Italia), y las medidas (kgf) se realizaron en la parte superior central de la corteza del pan.

was determined using NaOH 0.1 N until a final pH of 8.5 was reached, and was expressed in mL of NaOH 0.1 N necessary for titrating 10 g of dough (Sanz-Penella *et al.*, 2012).

Surface response methodology (SRM)

SRM was used to determine the optimum conditions of amount of lyophilized *xaxtle* (gX_L) and fermentation time (min) for making the bread. Two variables were used in this investigation: the amount of lyophilized *xaxtle* (0 to 10 g of *xaxtle* per 100 g of wheat flour) and the fermentation time (30 to 90 min) (Table 1).

The upper and lower limits were obtained from preliminary studies. The design and analysis of SRM were carried out with the program DesignExpertPlot 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.). The program was based on 13 experiments with five replicates of the central point, four factorial points and four axial points. The response variables evaluated were as follows: specific volume (SV) of the bread with *xaxtle*, texture (Tx) of the cortex and luminosity (L) of the crumb. The significance of the models (SV, Tx, L) was made with an ANOVA to identify the coefficient of correlation (r) of each response. In addition, the optimization tool D-optimum of DesignExpertPlot was used to obtain the grams of lyophilized *xaxtle* and fermentation time for making the bread. The value of the D-optimum is the result of the combination of three equations of surface response (specific volume, texture, and luminosity).

Specific volume (SV)

Specific volume of the bread was obtained through the displacement of turnip seed, according to the official method (10-05.01) of the AACC (2001) and with the formula:

Cuadro 1. Variables independientes con su nivel de variación para la fermentación usando sedimento de pulque (*xaxtle*) durante proceso de panificación.

Table 1. Independent variables with their variation level for fermentation using pulque sediment (*xaxtle*) during the bread making process.

Variables	Niveles de variación				
	-1.414	-1	0	1	1.41421
<i>Xaxtle</i> liofilizado (g 100 g ⁻¹ de harina)	1.55	3	6.5	10	11.44
Tiempo de fermentación (min)	17.57	30	60	90	102.42

Luminosidad (L)

La luminosidad se midió en la miga del pan, con equipo Color Made HDS (modelo 347805, Milton Roy Company, Diano Color Products, EE.UU.).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La miga del pan con *xaxtle* y del pan testigo se cortó en cubos de 4 mm con hojas de acero inoxidable; las muestras se pusieron en una solución de glutaraldehído al 2 % (pH 7) por 2 h a 25 °C, se lavaron con solución de sacarosa al 1 % en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.0, se fijaron con una solución de OsO₄ al 1 % por 2 h, y se lavaron otra vez con la solución de fosfato de sodio al 1 % (Bozzola y Russell, 1999). Las muestras se deshidrataron en serie usando soluciones de etanol al 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %, y tres veces con etanol absoluto (10 min de exposición por cada concentración). Todo el etanol se substituyó por CO₂, usando una secadora a punto crítico (Samdri 780 B, Rockville, MA, EE.UU.), las muestras se recubrieron con partículas de oro ionizado (Desk II, Denton Vacuum, MA, E.U.A) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5410LV, Peabody, MA, EE.UU.).

Determinación de la hidrólisis del almidón *in vitro*

La concentración de almidón total (AT) se determinó por el método de Goñi *et al.* (1997), utilizando un factor de conversión de glucosa a glucano de 0.9 y la concentración de almidón resistente (AR) se cuantificó por el método de Goñi *et al.* (1996). El almidón potencialmente disponible (AD) se obtuvo por diferencia entre el AT y el AR.

Las tasas de hidrólisis del almidón en pan con *xaxtle* y el pan testigo se determinaron de acuerdo con Granfeldt *et al.* (1992), usando 1 g de almidón potencialmente disponible (AD). El pan de caja se utilizó como referencia. Las muestras se incubaron con α -amilasa (EC 3.2.1.1) salival de seis individuos sanos y en ayunas (masticándolas 15 s), se disolvieron en 15 mL de solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 6.9 y se incubaron con pepsina (EC 3.4.23.1) a pH 1.5 (P-7012, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri 6331 03, EE.UU.) a 37 °C por 30 min con agitación. El pH se ajustó a 6.9 para una segunda incubación (37 °C de 0 a 180 min) usando α -amilasa (EC 3.2.1.1) (A-3107; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri 6331 03 EE.UU.) en bolsas de diálisis. Los productos hidrolizados y dializados fueron cuantificados en equivalente de maltosa con ácido 3,5-dinitrosalísico (D0550 Marca Sigma Chemical, Perth, Western Australia). La predicción de índice glucémico (pIG) se calculó usando datos del índice de hidrólisis con la fórmula:

$$\text{Specific volume (cm}^3 \text{ g}^{-1}) = \text{Bread volume (cm}^3) \times \text{bread weight (g)}$$

Texture (Tx)

Texture was evaluated with a penetrometer Model 327 Pressure Tester (EFFEGI, Italy), and the measurements (kgf) were made in the upper central part of the bread crust.

Luminosity (L)

Luminosity was measured in the bread crumb with the equipment Color Made HDS (model 347805, Milton Roy Company, Diano Color Products, U.S.A.).

Electronic scan microscopy (ESM)

The bread crumb with *xaxtle* and the control bread was cut in cubes of 4 mm with stainless steel sheets; the samples were placed introduced in a solution of glutaraldehyde at 2 % (pH 7) for 2 h at 25 °C, then were washed with a solution of saccharose at 1 % in a phosphate buffering solution 0.05 M pH 7.0 and were fixed with a solution of OsO₄ at 1 % for 2 h. They were washed again with the sodium phosphate solution at 1 % (Bozzola and Russell, 1999). The samples were dehydrated in a series using solutions of ethanol at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %, and three times with absolute ethanol (10 min of exposure for each concentration). The ethanol was totally substituted by CO₂, using a dryer to critical point (Samdri 780 B, Rockville, MA, U.S.A.). The samples were covered with ionized gold particles (Desk II, Denton Vacuum, MA, U.S.A.) and observed in an electronic scan microscope (JEOL 5410LV, Peabody, MA, U.S.A.).

Determination of *in vitro* starch hydrolysis

Total starch concentration (TS) was determined with the method of Goñi *et al.* (1997), utilizing a conversion factor of glucose to glucane of 0.9 and the concentration of resistant starch (RS) was quantified by the method of Goñi *et al.* (1996). The potentially available starch (AS) was obtained from the difference between the TS and the RS.

The rates of starch hydrolysis in bread with *xaxtle* and the control bread were determined according to Granfeldt *et al.* (1992), using 1 g of potentially available starch (AS). The commercial bread was used as reference. The samples were incubated with saliva α -amylase (EC 3.2.1.1) from six healthy and fasted individuals (chewing them for 15 s), dissolved in 15 mL of phosphate regulating solution, 0.05 M, pH 6.9 and were incubated with pepsin (EC 3.4.23.1) at pH 1.5 (P-7012,

$$pIG = (0.862 \times HI) + 8.19$$

Análisis estadístico

Todos los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones. Los grupos de datos fueron analizados con pruebas de ANDEVA y t-student. La prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar medias con el testigo mediante el software Minitab Versión 16.1.0 (Philadelphia State College, EE.UU., 2010). Además se usó el software DesignExpertPlot 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.) como herramienta de optimización para definir la cantidad de *xaxtle* y tiempo de fermentación óptimos para la elaboración del pan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica del *xaxtle*

El *xaxtle* presentó 95 g de agua, 2.2 g de proteínas, 0.6 g de cenizas, 546.8 mg de glucosa (azúcares reductores), 1.1 g de ácido láctico (informado por 100 g de muestra) y pH de 4.1. Estos componentes químicos promueven el crecimiento de microorganismos como las BAL, que son microorganismos para mejorar las características de aroma y sabor en varios alimentos fermentados (Paramithiotis *et al.* 2006).

Identificación de los microorganismos del *xaxtle*

El recuento en 1 g de *xaxtle* liofilizado (gX_L) fue $\sim 1 \times 10^8$ células microbianas viables, que se agregaron a las masas como cultivo iniciador, de las que 7×10^6 UFC·g⁻¹ fueron bacterias Gram positivas-Catalasa negativas (agar MRS) y las restantes 4×10^5 UFC·g⁻¹ cepas levaduriformes (agar PDA y SD), indicando que las bacterias ácido lácticas (Gram-positivas y Catalasa-negativas) están en mayor proporción en el *xaxtle*. El análisis de las secuencias amplificadas del gen 16S ARNr mostró que las bacterias en el *xaxtle* tenían una gran similitud con el género de *Lactobacillus*, así como la presencia de las levaduras *S. paradox* MESP1 y *S. cerevisiae* MESP2, cuyas secuencias están en el GenBank con los números de acceso KT954183 y KT954184. Escalante *et al.* (2004, 2008) indicaron que los principales microorganismos presentes en la etapa final de la fermentación del pulque son los *Lactobacillus* (88.1 % de los clones totales). Las BAL son microorganismos importantes en el pulque porque pueden fermentar glucosa, fructosa

Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri 6331 03, U.S.) at 37 °C for 30 min with agitation. The pH was adjusted to 6.9 for a second incubation (37 °C from 0 to 180 min) using α -amylase (EC 3.2.1.1) (A-3107; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri 6331 03, U.S.A.) in dialysis bags. The hydrolyzed and dialyzed products were quantified in equivalent of maltose with 3,5-dinitrosalisilic acid (D0550 Sigma Chemical, Perth, Western Australia). The prediction of glucemic index (pGI) was calculated using data of the hydrolysis index with the formula:

$$pGI = (0.862 \times HI) + 8.19$$

Statistical analysis

All of the results are the average of at least three replicates. The groups of data were analyzed with ANOVA and t-student tests. The Tukey test ($p \leq 0.05$) was used to compare means with the control using the software Minitab Version 16.1.0 (Philadelphia State College, U.S.A., 2010). In addition, the software DesignExpertPlot 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) was used as an optimization tool to define the optimum amount of *xaxtle* and fermentation time for bread making.

RESULTADOS AND DISCUSSION

Phytochemical characterization of *xaxtle*

The *xaxtle* presented 95 g of water, 2.2 g of proteins, 0.6 g of ash, 546.8 g of glucose (reductive sugars), 1.1 g of lactic acid (shown by 100 g of sample) and pH of 4.1. These chemical components promote the growth of microorganisms such as the LABs, which are microorganisms that improve the characteristics of aroma and flavor in various fermented foods (Paramithiotis *et al.*, 2006).

Identification of the microorganisms of the *xaxtle*

The quantification in 1 g of lyophilized *xaxtle* (gX_L) was $\sim 1 \times 10^8$ viable microbial cells, which were added to the doughs as culture starter, of which 7×10^6 UFC·g⁻¹ were Gram positive bacteria-negative Catalase (MRS agar) and the remaining 4×10^5 UFC·g⁻¹ yeast forming strains (PDA and SD agar), indicating that the lactic acid bacteria (Gram-positive and Catalase-negative) are in higher proportion in the *xaxtle*. The analysis of the amplified sequences of the gene 16S RNAr showed that the bacteria in the

y sacarosa, presentes en aguamiel, produciendo ácido (D o L) láctico. Además, esos microorganismos pueden resistir alta concentración de etanol y crecer en ambientes ácidos (pH 4.5) característicos del pulque (Carr *et al.* 2002). Aunque el pH del *xaxtle* fue 4.1, los recuentos bacterianos indicaron viabilidad de 7×10^6 UFC·gX_L⁻¹, y estos resultados son similares a los obtenidos por Valadez-Blanco *et al.* (2012), con 7.1×10^7 UFC·mL⁻¹ para muestras de pulque de Oaxaca.

Metodología de superficie de respuesta

Volumen específico (VE)

El volumen específico (VE) es una característica importante en el pan por ser un parámetro de calidad. El coeficiente de correlación ($r=0.82$) del modelo mostró un ajuste de los datos experimentales y una $p=0.036$ (Tukey). La cantidad de *xaxtle* y el tiempo de fermentación están estrechamente correlacionados con la superficie de respuesta representada por la ecuación de regresión múltiple (Ecuación 1) del volumen específico del pan, que indica hasta 82 % la asociación de los dos factores (Figura 1).

$$VE = 1.23 + 9.37 \times 10^{-3} gX_L - 0.06 \times 10^{-3} t + 4.75 \times 10^3 gX_L^2 + 1.09 \times 10^{-4} t^2 - 1.03 \times 10^{-3} gX_L t$$

El uso de 3 gX_L como inóculo para fermentar la masa desde 30 hasta 90 min, aumentó el volumen específico (a 90 min, VE=1.31 cm³·g⁻¹), pero este fue menor comparado con el pan testigo (VE=2.73 cm³·g⁻¹). Lo anterior se relaciona con el reporte de Rollán *et al.* (2005), de que un pH de 3.5 a 4.0 en masas de panificación puede activar las enzimas proteolíticas, modificar la estructura del gluten, y producir un menor volumen.

Las masas inoculadas con *xaxtle* presentaron 10⁶ UFC por g de masa (10⁸ UFC en 300 g de harina), de las cuales 7×10^4 UFC·g⁻¹ correspondieron a las BAL y 4×10^3 UFC·g⁻¹ a las levaduras. El recuento de UFC en las masas después de 90 min de fermentación fue 5.18×10^9 UFC·g⁻¹ para las BAL y 1.3×10^5 UFC·g⁻¹ para las levaduras. El aumento de las BAL en las masas fermentadas con *xaxtle* (3 gX_L, 90 min fermentación) redujo ($p=0.00$) el pH desde 6.1 a 4.5; mientras que en las masas inoculadas con *S. cerevisiae* el pH se mantuvo constante a 6.1. En conjunto, estos

xaxtle had high similarity to the genus *Lactobacillus*, as well as presence of the yeasts *S. paradox* MESP1 and *S. cerevisiae* MESP2, whose sequences are in the GenBank with the access numbers KY954183 and KT954184. Escalante *et al.* (2004, 2008) indicated that the main microorganisms present in the final stage of fermentation of pulque are the *Lactobacillus* (88.1 % of the total clones). The LABs are important microorganisms in pulque because they can ferment glucose, fructose and saccharose, present in *aguamiel*, (fresh unfermented maguey sap) producing lactic acid (D or L). Furthermore, these microorganisms can resist high concentration of ethanol and grow in acid environments (pH 4.5) characteristic of pulque (Carr *et al.*, 2002). Although the pH of the *xaxtle* was 4.1, the bacteria counts indicated a viability of 7×10^6 UFC·gX_L⁻¹. These results are similar to those obtained by Valadez-Blanco *et al.* (2012), with 7.1×10^7 UFC·mL⁻¹ for pulque samples from Oaxaca.

Surface response methodology

Specific volume (SV)

Specific volume (SV) is an important characteristic in bread because it is a parameter of quality. The coefficient of correlation ($r=0.82$) of the model showed an adjustment of the experimental data and a $p=0.36$ (Tukey). The amount of *xaxtle* and fermentation time are closely correlated with the surface response represented by the multiple regression equation (Equation 1) of the specific bread volume, which indicates as much as 82 % association of the two factors (Figure 1).

$$SV = 1.23 + 9.37 \times 10^{-3} gX_L - 0.06 \times 10^{-3} t + 4.75 \times 10^3 gX_L^2 + 1.09 \times 10^{-4} t^2 - 1.03 \times 10^{-3} gX_L t$$

The use of 3 gX_L as inoculum to ferment the dough from 30 to 90 min increased the specific volume (at 90 min, SV=1.31 cm³·g⁻¹), but this was lower as compared to the control bread (SV=2.73 cm³·g⁻¹). The above is related to the report of Rollán *et al.* (2005) that a pH of 3.5 to 4.0 in bread dough can activate the proteolytic enzymes, modify the gluten structure and produce a lower volume.

The dough inoculated with *xaxtle* presented 10⁶ UFC per g of dough (10⁸ UFC in 300 g of flour), of which 7×10^4 UFC·g⁻¹ corresponded to the LABs

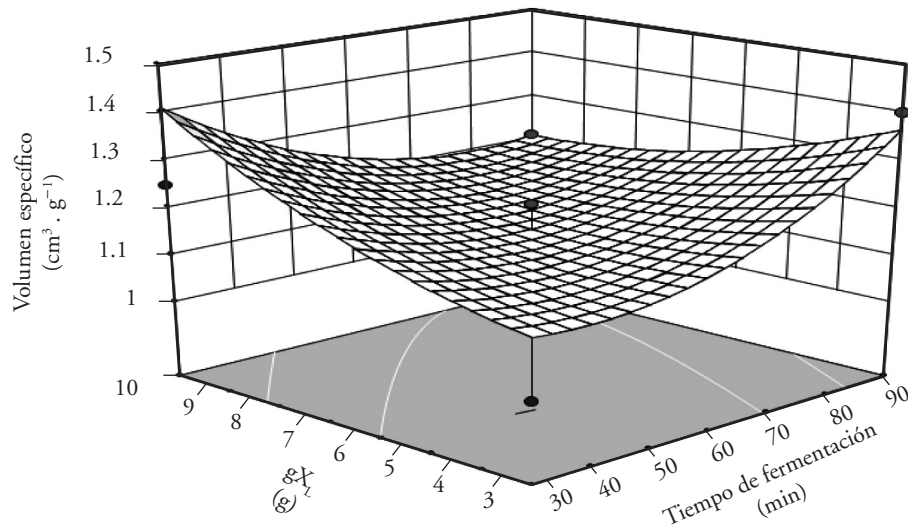


Figura 1. Análisis de superficie de respuesta del volumen específico ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) de pan fermentado a distintas concentraciones de *xaxtle* liofilizado y tiempos de fermentación.

Figure 1. Analysis of surface response of specific volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) of bread fermented at different concentrations of lyophilized *xaxtle* and fermentation times.

resultados indicaron que las BAL del *xaxtle* pueden adaptarse a los ingredientes de panificación durante la fermentación. Las bacterias lácticas emplean varias vías metabólicas para usar el almidón como fuente de carbono, usando la vía de las pentosas, hexosas y la vía 6 fosfato gluconato/cetolasa, produciendo ácido láctico, ácido acético, en algunos casos CO_2 y etanol, como productos finales de la fermentación (Corsetti y Settanni, 2007). También hay una estrecha relación entre la reducción de pH en las masas madre y el aumento de las UFC de BAL, y una relación 1:100 de levaduras con respecto a las BAL. La prevalencia de las bacterias lácticas sobre las levaduras se debe a la competencia por sustratos, como la maltosa, disacárido que forma parte de la composición química de la harina de trigo. Paramithiotis *et al.* (2006) señalaron que en fermentaciones en masas madre, *L. brevis* ACA-DC 3407 predomina sobre *S. cerevisiae* ACA-YC 5065, porque presentan antagonismo por maltosa, reducen el crecimiento de las levaduras e influyen en la reducción del pH por la producción de ácidos ácido láctico y ácido acético. Además, Gänzle *et al.* (2008) y Katina *et al.* (2005) indicaron que los *Lactobacillus* influyen negativamente en la producción de CO_2 por levaduras, y el resultado es un desarrollo bajo de los alveolos (porosidad) en los productos horneados y, por lo tanto, volumen específico bajo.

and 4×10^3 UFC· g^{-1} to the yeasts. The count of UFC in the dough after 90 min of fermentation was 5.18×10^9 UFC· g^{-1} for the LABs and 1.3×10^5 UFC· g^{-1} for the yeasts. The amount of the LABs in the doughs fermented with *xaxtle* (3 gX_L , 90 min fermentation) reduced ($p=0.00$) the pH from 6.1 to 4.5; whereas in the doughs inoculated with *S. cerevisiae* the pH was maintained constant at 6.1. Together, these results indicated that the LABs of the *xaxtle* can adapt to bread-making ingredients during fermentation. The lactic bacteria use various metabolic pathways to utilize the starch as carbon source, using the pathway of the pentoses, hexoses and pathway 6 phosphate gluconate/ketolase, producing lactic acid, acetic acid, in some cases CO_2 and ethanol, as final products of the fermentation (Corsetti and Settanni, 2007). Also, there is a close relationship between the reduction of pH in the mother doughs and the increment of the UFCs of LAB, with a ratio of 1:100 of yeasts with respect to the LABs. The prevalence of the lactic bacteria over the yeasts is due to the competition for substrates, such as maltose, disaccharide that forms part of the chemical composition of the wheat flour. Paramithiotis *et al.* (2006) pointed out that in fermentation in mother doughs, *L. brevis* ACA-DC 3407 predominates over *S. cerevisiae* ACA-YC 5065, due to the fact that they

Textura (Tx)

En la superficie de respuesta de textura (Figura 2) se observó que el factor del contenido de *xaxtle* liofilizado tuvo influencia mayor sobre la textura del producto. Los datos fueron ajustados en una ecuación (2) cuadrática, el coeficiente de correlación ($r=0.823$) y el ANDEVA del modelo indican que el ajuste experimental tiene una $p=0.014$.

$$Tx = 0.07 + 0.27 gX_L + 0.02 t + 2.32 \times 10^{-3} gX_L^{-2} - 9.79 \times 10^{-5} t^2 - 2.73 \times 10^{-3} gX_L t$$

En la Figura 2 se observa que con 3 g de *xaxtle* liofilizado por cada 100 g de harina de trigo y con un tiempo de fermentación de 90 min, la textura del pan fue 1.48 kgf, y para el pan elaborado con 3 g de *S. cerevisiae* y 90 min de fermentación la textura fue 0.9 kgf.

Los resultados están altamente correlacionados con los valores de volumen específico: un pan con mayor volumen se debe al desarrollo de gluten (red proteica), a la formación de alvéolos en la masa y al CO₂ producido durante la fermentación, haciéndolo menos compacto y por lo tanto con una fuerza de penetración menor, lo cual se relaciona con un valor de textura más bajo (Cauvain y Young, 2007).

present antagonism for maltose, reducing the growth of the yeasts and influencing the reduction of the pH by the production of organic acids (lactic acid and acetic acid). Furthermore, Gänzle *et al.* (2008) and Katina *et al.* (2005) indicated that the *Lactobacillus* have a negative influence on the production of CO₂ by yeasts, giving as a result a low development of the alveolus (porosity) in the baked products, and therefore, low specific volume.

Texture (Tx)

In the surface response of texture (Figure 2), it was observed that the factor of the lyophilized *xaxtle* content has a greater influence on the texture of the product. The data were fitted in a quadratic equation (2), the coefficient of correlation ($r=0.823$) and the ANOVA of the model indicate that the experimental fit has a $p=0.014$.

$$Tx = 0.07 + 0.27 gX_L + 0.02 t + 2.32 \times 10^{-3} gX_L^{-2} - 9.79 \times 10^{-5} t^2 - 2.73 \times 10^{-3} gX_L t$$

In Figure 2 it is observed that with 3 g of lyophilized *xaxtle* for every 100 g of wheat flour and with a fermentation time of 90 min, the bread texture was 1.48 kgf, and for the bread made with

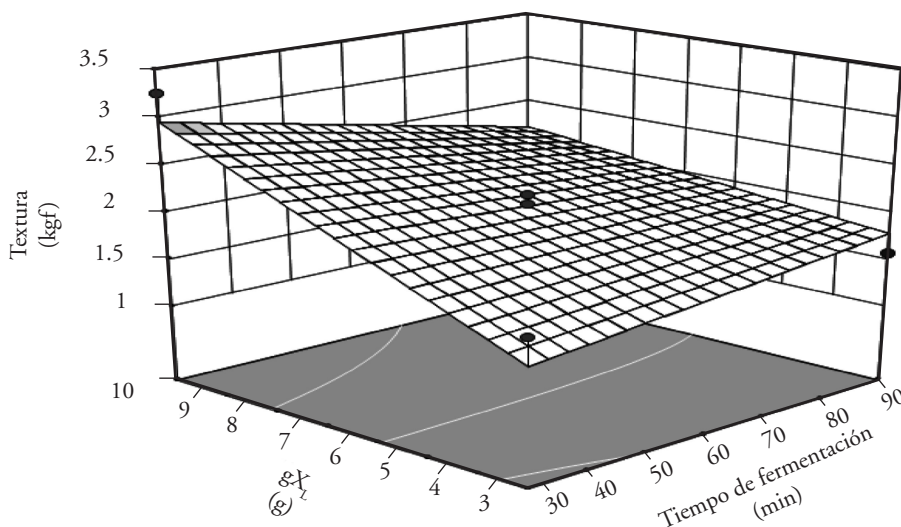


Figura 2. Análisis de superficie de respuesta de textura (kgf) de pan a distintas concentraciones de *xaxtle* liofilizado y tiempos de fermentación.

Figure 2. Analysis of surface response of texture (kgf) of bread at different concentrations of lyophilized *xaxtle* and fermentation times.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Sanz-Penella *et al.* (2012), quienes muestran diferencia en el aumento de la fuerza de penetración (mayor valor de textura) en panes de masas fermentadas con *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 a concentraciones del 5, 10, 15 y 20 %, con respecto a *S. cerevisiae*.

Luminosidad de la miga (L)

La luminosidad de la miga del pan evalúa el grado de la luz reflejada por esta compleja estructura porosa y viscoelástica. La regresión de los datos fue ajustada a un modelo cuadrático (Ecuación 3) y el coeficiente de correlación fue 0.92 (p=0.001). Las variables influyeron hasta 91 % en el comportamiento del parámetro L (Figura 3).

La ecuación cuadrática es la siguiente:

$$L = 84.6 - 4.24 gX_L - 0.22t + 0.17 \times 10^{-3} gX_L^2 + 9.58 \times 10^{-1} t^2 - 0.19 gX_L t$$

El contenido de *xaxtle* influye en la luminosidad de las migas del pan, desde 55.6 hasta 71.2 U.R.R. (Unidades de Reflectancia Relativa), es decir, a mayor concentración de *xaxtle*, menor luminosidad de la miga del pan debido al color del inóculo (marrón) y al menor contenido de humedad, el cual está

3 g of *s. cerevisiae* and 90 min of fermentation, the texture was 0.9 kgf.

The results are highly correlated with the values of specific volume: a bread with greater volume is due to the development of gluten (protein network), the formation of alveoli in the dough and to the CO₂ produced during fermentation, making it less compact and therefore with a lower penetration force, which is related with a lower value of texture (Cauvain and Young, 2007). These results agree with what was described by Sanz-Penella *et al.* (2012), who show differences in the increase of penetration force (higher value of texture) in breads of dough fermented with *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 at concentrations of 5, 10, 15 and 20 %, with respect to *S. cerevisiae*.

Crumb luminosity (L)

The bread crumb luminosity evaluated the degree of light reflected by this complex, porous and viscoelastic structure. The regression of the data was fitted to a quadratic model (Equation 3) and the coefficient of correlation was 0.92 (p=0.001). The variables had an influence of as much as 91 % on the behavior of parameter L (Figure 3).

The quadratic equation is as follows:

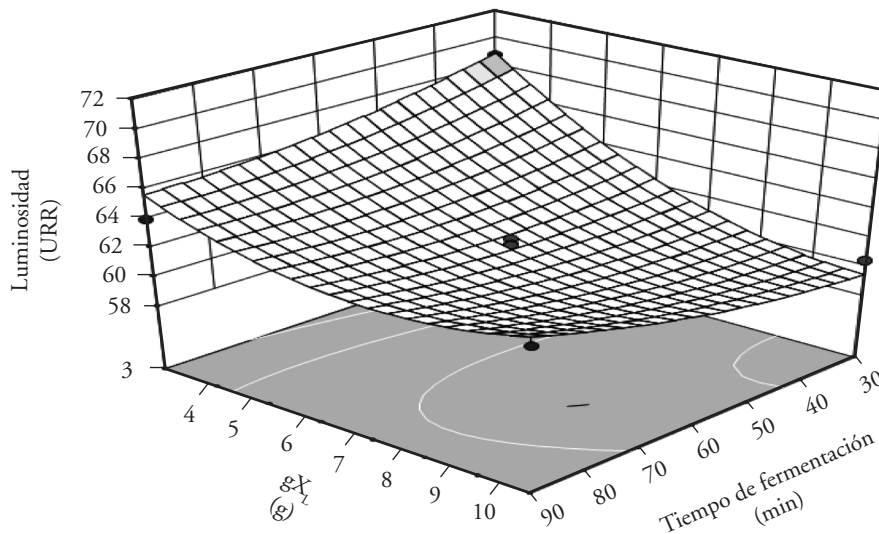


Figure 3. Análisis de la superficie de respuesta para luminosidad (U.R.R.) de pan fermentado a distintas concentraciones de *xaxtle* liofilizado y tiempos de fermentación.

Figure 3. Analysis of surface response for luminosity (R.R.U.) of bread fermented at different concentrations of lyophilized *xaxtle* and fermentation times.

directamente relacionado con el parámetro L. Los resultados en nuestro estudio fueron similares a los de panes fermentados con *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919 con un intervalo de luminosidad de 55.5 a 57.8 U.R.R. (Sanz-Penella *et al.*, 2012).

Condiciones óptimas para la elaboración de pan fermentado *xaxtle*

La zona óptima para la elaboración de pan con *xaxtle* correspondió a la sobreposición de las gráficas de contorno y las ecuaciones de regresión múltiple del volumen específico del pan (cm³ g⁻¹), textura (kgf) y luminosidad (L). Las soluciones propuestas por DesignExpert se muestran en el Cuadro 2.

Para el volumen específico del pan con *xaxtle* la zona óptima varió de 1.23 a 1.51 cm³ g⁻¹, la textura entre 1.73 y 1.85 kgf y la luminosidad de la miga de 66 U. R. R. de 84 a 99 min de fermentación y una concentración de *xaxtle* liofilizado de 2.37 a 3.4 g por 100 g de harina de trigo. De acuerdo con la D-óptima del programa, las condiciones óptimas fueron 3 g de *xaxtle* liofilizado y 90 min de fermentación.

Para el volumen específico del pan con *xaxtle*, la zona óptima varió de 1.23 a 1.51 cm³ g⁻¹, la textura entre 1.73 y 1.85 kgf y la luminosidad de la miga de 66 U.R.R. de 84 a 99 min de fermentación y una concentración de *xaxtle* liofilizado de 2.37 a 3.4 g por 100 gde harina. De acuerdo con la D-óptima del programa, las condiciones óptimas fueron 3 g de *xaxtle* liofilizado y 90 min de fermentación.

Microestructura de la miga

En las microestructuras del pan con *xaxtle* y pan con *S. cerevisiae* se observaron gránulos de almidón

$$L = 84.6 - 4.24 gX_L - 0.22t + 0.17 \times 10^{-3} gX_L^2 + 9.58 \times 10^{-1} t^2 - 0.19 gX_L t$$

The content of *xaxtle* influenced the luminosity of the bread crumbs, from 55.6 to 71.2 R.R.U. (Relative Reflectance Units). That is, the higher the concentration of *xaxtle*, the lower the bread luminosity due to the color of the inoculum (brown) and to the lower moisture content, which is directly related to the parameter L. The results in our study were similar to those of fermented breads employing *B. pseudocatenulatum* ATCC 27919 with a luminosity interval of 55.5 to 57.8 R.R.U. (Sanz-Penella *et al.*, 2012).

Optimum conditions for making *xaxtle* fermented bread

The optimum zone for baking bread with *xaxtle* corresponded to the superposition of the graphs of contour and the multiple regression equations of specific volume of the bread (cm³ g⁻¹), texture (kgf) and luminosity (L). The solutions proposed by DesignExpertPlot are shown in Table 2.

For specific volume of the bread with *xaxtle*, the optimum zone varied from 1.23 to 1.51 cm³·g⁻¹, the texture between 1.73 and 1.85 kgf and crumb luminosity of 66 R.R.U. from 84 to 99 min of fermentation time and a lyophilized *xaxtle* concentration of 2.37 to 3.4 g per 100 g of wheat flour. According to the D-optimum of the program, the optimum conditions were 3 g of lyophilized *xaxtle* and 90 min of fermentation.

For specific volume of the bread with *xaxtle*, the optimum zone varied from 1.23 to 1.51 cm³·g⁻¹, the texture 1.73 and 1.85 kgf and the luminosity of the crumb of 66 R.R.U. of 84 to 99 min of fermentation

Cuadro 2. Soluciones para conocer la optimización de concentración de *xaxtle* liofilizado (gX_L 100 g⁻¹ harina de trigo) y el tiempo de fermentación (min) de la masa.

Table 2. Solutions to know the optimization of concentration of lyophilized *xaxtle* (gX_L 100g⁻¹ wheat flour) and fermentation time (min) of the dough.

Solución	<i>Xaxtle</i> liofilizado (gX _L 100 g ⁻¹ de harina de trigo)	Tiempo de fermentación (min)	Volumenespecífico (cm ³ ·g ⁻¹)	Textura Kgf	L (U.R.R.)	Deseabilidad (D-óptima)
1	3.0	90	1.36	1.82	66	0.79
2	3.0	89	1.35	1.81	66	0.79
3	3.35	90	1.35	1.84	65	0.76

(GA) de distintos tamaños (Figura 4). En el pan con *xaxtle* se observó una escasa película de gluten (PG), probablemente debida a la fermentación producida por las BAL presentes en el *xaxtle* (Figura 4a y 4b). Las BAL pueden modificar la estructura de los productos de panificación debido a su actividad proteolítica (Gänzle *et al.* 2008). La miga del pan con *xaxtle* fue más compacta que la miga del pan elaborado con *S. cerevisiae*, y según Kusunose *et al.* (1999), en la interacción entre levaduras y bacterias ácido-lácticas disminuye el CO₂, debido a la competición de sustratos.

Sanz-Penella *et al.* (2012) observaron que durante la fermentación de masas con BAL, la matriz proteínica y los granos de almidón son degradados, reduciendo significativamente el volumen específico de los productos horneados. Las masas inoculadas con

and a concentration of lyophilized *xaxtle* of 2.37 to 3.4 g per 100 g of wheat flour. According to the D-optimum of the program, the optimum conditions were 3 g of lyophilized *xaxtle* and 90 min of fermentation.

Microstructure of the bread crumb

In the microstructures of the bread with *xaxtle* and bread with *S. cerevisiae*, starch granules (SG) of different sizes were observed (Figure 4). In the bread with *xaxtle* there was a scant film of gluten (GF), probably due to the fermentation produced by the LABs present in the *xaxtle* (Figure 4a and 4b). The LABs can modify the structure of the baked products due to their proteolytic activity (Gänzle *et al.*, 2008). The bread crumb with *xaxtle* was more compact

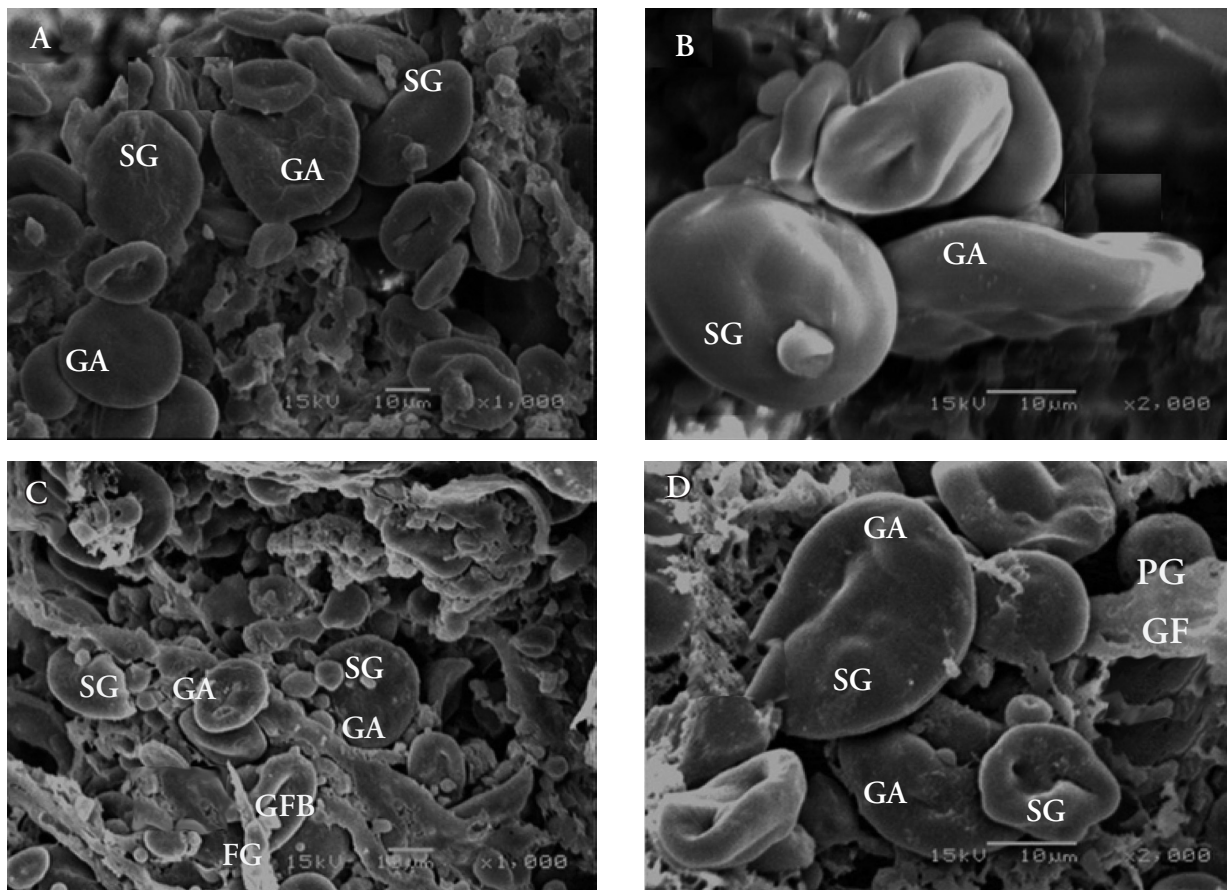


Figura 4. Micrografías de la miga del A) y B) pan con *xaxtle*; C) y D) pan con *Saccharomyces cerevisiae*. GA gránulos de almidón, FG fibrillas de gluten y PG película de gluten. 1000x (A, C), 2000x (B, D). Barra 10 µm.

Figure 4. Micrographs of the crumb of A) and B) bread with *xaxtle*; C) and D) bread with *Saccharomyces cerevisiae*. SG starch granules. GFB gluten fibrils and GF gluten film. 1000x (A, C), 2000x (B, D). Bar 10 µm.

xaxtle tuvieron una producción significativa ($p=0.00$) de ATT (ácidos orgánicos) de 11.3 mL NaOH 0.1 N mayor que las masas fermentadas con *S. cerevisiae* con una ATT de 2.3 mL NaOH 0.1 N. La acidez titulable total de las masas con *xaxtle* influyó en la formación de las estructuras durante el amasado, ya que el desarrollo del gluten es afectado por dicha acidez, lo cual se muestra en la microestructura de la miga del pan (Figura 4). El desarrollo del gluten y la correspondiente formación de la estructura se deben a que durante la incubación de las masas ocurren cambios bioquímicos, como la fermentación láctica, acética y alcohólica, además de una proteólisis debido a las enzimas endógenas microbianas que se activan por el descenso del pH (Corsetti y Settanni, 2007). El sistema proteolítico de las BAL hidrolizan las proteínas a péptidos pequeños y aminoácidos, los cuales son importantes para el crecimiento de estas bacterias. Según Zotta *et al.* (2007), las gliadinas, una de las proteínas del gluten, pueden fragmentarse a un tamaño de 20 a 27 kDa.

La estructura de la miga del pan elaborado con *S. cerevisiae* (Figura 4C y 4D) fue menos densa que la del pan elaborado con *xaxtle* (Figura 4A y 4B). Además, en el pan testigo se observó un película de gluten (PG) bien desarrollada con algunos espacios esféricos vacíos que corresponden a alvéolos de gas formados por la producción de CO_2 , y se encontró que los gránulos de almidón (GA) están recubiertos por la red proteica. La matriz proteica fue totalmente desarrollada en el pan con *S. cerevisiae* formando PG en la estructura, mientras que el pan con *xaxtle* no fue muy bien desarrollada, lo cual está relacionado con el efecto del sistema proteolítico de las BAL (Corsetti y Settanni, 2007).

Hidrólisis *in vitro* del almidón

El contenido de almidón total del pan con *xaxtle* fue 9.8 %, significativamente ($p=0.003$) menor que el pan con *S. cerevisiae* (Cuadro 3). Esto se puede explicar por la fermentación del almidón por BAL, y este almidón se usa como sustrato para producir ácidos orgánicos (Liljeberg *et al.* 1996). El contenido de almidón resistente total en el pan con *xaxtle* fue 3.57 %, similar al pan con *S. cerevisiae* ($p=0.067$). El pan con *xaxtle* presentó un contenido de almidón disponible de 3.93 %, significativamente menor ($p=0.003$) que el pan con *S. cerevisiae*. Liljeberg *et al.*

than the bread crumb elaborated with *S. cerevisiae*, and according to Kusunose *et al.* (1999), in the interaction between yeasts and lactic acid bacteria, there is a reduction in CO_2 due to the competition for substrates.

Sanz-Penella *et al.* (2012) observed that during the fermentation of doughs with LAB, the protein matrix and the starch granules are degraded, significantly reducing the specific volume of the baked products. The doughs inoculated with *xaxtle* had a significant production ($p=0.00$) of TTA (organic acids) of 11.3 mL NaOH 0.1 N higher than the doughs fermented with *S. cerevisiae* with a TTA of 2.3 mL NaOH 0.1 N. The total titratable acid of the doughs with *xaxtle* influenced the formation of the structures during kneading, given that the development of the gluten is affected by this acidity, which is shown in the microstructure of the bread crumb (Figure 4). The development of the gluten and the corresponding formation of the structure are due to the fact that during the incubation of the doughs, biochemical changes take place, such as lactic, acetic and alcoholic fermentation, in addition to a proteolysis due to the microbial endogenous enzymes that are activated by the drop in pH (Corsetti and Settanni, 2007). The proteolytic system of the LABs hydrolyzes the proteins to small peptides and amino acids, which are important for the growth of these bacteria. According to Zotta *et al.* (2007), the gliadins, one of the proteins of gluten, can be fragmented to a size of 20 to 27 kDa.

Cuadro 3. Contenido de almidón total (AT), almidón resistente total (ART) y almidón disponible (AD) de pan (g por 100 g de muestra) fermentado con *xaxtle* y pan fermentado con *S. cerevisiae*.

Table 3. Total starch content (TS), total resistant starch (TRS) and available starch (AS) of bread (g per 100 g of sample) fermented with *xaxtle* and bread fermented with *S. cerevisiae*.

Fración de almidón	Pan con <i>xaxtle</i>	Pan con <i>S. cerevisiae</i> (testigo)
AT	57.6 ± 1.82 a	61.8 ± 1.21 b
ART	3.57 ± 0.63 a	3.89 ± 0.41 a
AD a	54.1	57.9

aART-AT=AD. Letras diferentes en un renglón indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) ♦ aART-AT = AD. Different letters in a row indicate significant difference ($p \leq 0.05$).

(1996) reportaron un incremento de almidón resistente y ácido láctico en productos elaborados con masas *sourdough* (más de 5 h de fermentación).

Las curvas de hidrólisis están expresadas en porcentaje de almidón hidrolizado (%H) durante la hidrólisis *in vitro* (Figura 5). El pan blanco de caja de una marca comercial se usó como referencia en este análisis, con un porcentaje de hidrólisis de 25.8 %. Osorio-Díaz *et al.* (2005) señalaron que el pan blanco (de referencia) tuvo una hidrólisis similar después de 180 min de incubación (28 %). El comportamiento de las curvas muestra que a partir del minuto 60, la hidrólisis del pan con *xaxtle* presentó diferencia significativa ($p=0.025$) respecto al pan con *S. cerevisiae*.

El comportamiento del grado de hidrólisis del pan con *xaxtle* fue influenciado por la reducción del pH y la hidrólisis de los gránulos de almidón realizada por los microorganismos del *xaxtle*. En algunos casos, según Scazzina *et al.* (2009), el uso de masas fermentadas *sourdough* mejoró la respuesta de glucosa en sangre, donde los ácidos orgánicos retrasaron el vaciado gástrico, incluso sin afectar la accesibilidad del almidón.

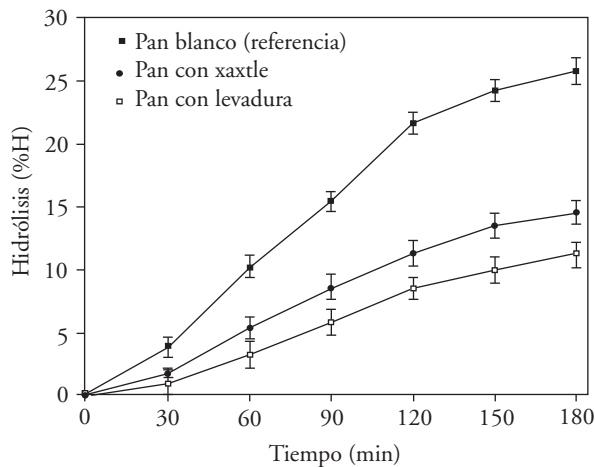


Figura 5. Porcentajes de hidrólisis del almidón determinados después de incubación con pepsina (EC 3.4.23.1) y con α -amilasa (EC 3.2.1.1) en pan blanco de caja (referencia), pan elaborado con *xaxtle*, pan elaborado con levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*).

Figure 5. Percentages of hydrolysis of the starch determined after incubation with pepsin (EC3.4.23.1) and with α -amylase (EC3.2.1.1) in white commercial bread (reference), bread made with *xaxtle*, bread made with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

The structure of the bread crumb elaborated with *S. cerevisiae* (Figure 4C and 4D) was less dense than that of the bread elaborated with *xaxtle* (Figure 4A and 4B). Furthermore, in the control bread a well developed film of gluten was observed with some empty spherical spaces that correspond to alveoli of gas formed by the production of CO_2 , and it was found that the starch granules (SG) are covered by the protein network. The protein network was totally developed in the bread with *S. cerevisiae* forming PG in the structure, while the bread with *xaxtle* was not very well developed, which is related to the effect of the proteolytic system of the LABs (Corsetti and Settanni, 2007).

In vitro hydrolysis of the starch

The total starch content of the bread with *xaxtle* was 9.8 %, significantly ($p=0.003$) lower than the bread with *S. cerevisiae* (Table 3). This may be explained by the fermentation of the starch by LAB, and this starch is used as substrate to produce organic acids (Liljeberg *et al.*, 1996). The total resistant starch content in the bread with *xaxtle* was 3.57 %, similar to the bread with *S. cerevisiae* ($p=0.067$). The bread with *xaxtle* presented an available starch content of 3.93 %, significantly lower ($p=0.003$) than the bread with *S. cerevisiae*. Liljeberg *et al.* (1996) reported an increment of resistant starch and lactic acid in products made with sourdough (more than 5 h of fermentation).

The hydrolysis curves are expressed in percentage of hydrolyzed starch (%H) during the *in vitro* hydrolysis (Figure 5). The white sliced bread of a commercial brand was used as reference in this analysis, with a percentage of hydrolysis of 25.8 %. Osorio-Díaz *et al.* (2005) indicated that the white bread (of reference) had a similar hydrolysis after 180 min of incubation (28 %). The behavior of the curves shows that after minute 60, the hydrolysis of the bread with *xaxtle* presented significant difference ($p=0.025$) with respect to the bread with *S. cerevisiae*.

The behavior of the degree of hydrolysis of the bread with *xaxtle* was influenced by the reduction of the pH and the hydrolysis of the starch granules by the microorganisms of the *xaxtle*. In some cases, according to Scazzina *et al.* (2009), the use of sourdough improved the response of glucose in blood, where the organic acids delayed the gastric

Las áreas bajo la curva de la hidrólisis del almidón para el pan con *xaxtle* y para el pan con *S. cerevisiae* fueron correlacionadas con el área del pan blanco de caja (de referencia) y se calculó la predicción de índice glucémico (pIG). La pIG del pan con *xaxtle* fue significativamente menor ($p=0.03$) con 51.8 que el pan con *S. cerevisiae* con 56.2. La reducción del pIG podría deberse a la acción metabólica de las bacterias ácido lácticas del *xaxtle*; el contenido de ácidos orgánicos en las masas con *xaxtle* favoreció una reducción del pIG (Åkerberg *et al.* 1998; Scazzina *et al.* 2009). La ATT de las masas inoculadas con *xaxtle* fue mayor (11.78 ± 0.2 mL de NaOH) que para las masas inoculadas con *S. cerevisiae* (2.62 ± 0.29 mL de NaOH); el contenido de ácido láctico fue mayor para las masas con *xaxtle* (0.11 ± 0.002 g 100 g⁻¹ de masa), respecto a las masas con *S. cerevisiae* (0.02 ± 0.003 g 100 g⁻¹ de masa). El mismo comportamiento fue observado para el ácido acético con 0.07 ± 0.001 g 100 g⁻¹ y 0.016 ± 0.002 g 100 g⁻¹ de masa, respectivamente.

De acuerdo con los valores de la pIG y a la clasificación de Bjorck *et al.* (1994), el pan elaborado con *xaxtle* tiene índice glucémico bajo. Además, un alimento de IG bajo produce un grado mayor de saciedad, debido principalmente a que la hidrólisis y asimilación de los hidratos de carbono es menor que en los alimentos con mayor IG Noriega *et al.* (2001).

CONCLUSIONES

La cantidad óptimas de *xaxtle* adicionada y el tiempo de fermentación de la masa durante la elaboración del pan favorecieron la reducción de pH y el aumento de acidez por las bacterias ácido lácticas, así influyendo en los cambios estructurales, en el contenido del almidón disponible y en la disminución del índice glucémico del pan. El uso del *xaxtle* como inóculo en panificación podría utilizarse en la fermentación de masas para obtener productos de panificación de índice glucémico bajo.

AGRADECIMIENTOS

El estudiante de doctorado Edgar Torres Maravilla agradece la beca otorgada por el CONACyT. Este trabajo fue desarrollado con la financiación del proyecto SIP 20100876, de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN) México y CONACyT-México.

emptying, even without affecting the accessibility of the starch.

The areas below the curve of the hydrolysis of the starch for the bread with *xaxtle* and for the bread with *S. cerevisiae* were correlated with the area of the white commercial bread (reference) and the prediction of glucemic index (pGI) was calculated. The pGI of the bread with *xaxtle* was significantly lower ($p=0.03$) with 51.8 than the bread with *S. cerevisiae* with 56.2. The reduction of the pGI may be due to the metabolic action of the lactic acid bacteria of the *xaxtle*. the content of organic acids in the doughs with *xaxtle* favored a reduction of the pGI (Åkerberg *et al.*, 1998; Scazzina *et al.*, 2009). The TTA of the dough inoculated with *xaxtle* was higher (11.78 ± 0.2 mL of NaOH), the lactic acid content was higher for the dough with *xaxtle* (0.11 ± 0.002 g 100 g⁻¹ of dough), than for the dough with *S. cerevisiae* (0.02 ± 0.003 g 100 g⁻¹ of dough). The same behavior was observed for the acetic acid with 0.07 ± 0.001 g 100 g⁻¹ and 0.016 ± 0.002 g 100 g⁻¹ of dough, respectively.

According to the values of the pGI and the classification of Bjorck *et al.* (1994), the bread made with *xaxtle* has a low glucemic index. Besides, a food of low GI produces a higher degree of satiety, due principally to the fact that the hydrolysis and the assimilation of the carbon hydrates is lower than in the foods with higher GI Noriega *et al.* (2001).

CONCLUSIONS

The optimum amount of *xaxtle* added and the fermentation time of the dough during bread making favored the reduction of pH and the increase in acidity from the lactic acid bacteria, thus influencing the structural changes, the available starch content and the reduction of the glucemic index of the bread. The use of *xaxtle* as inoculum in bread making could be utilized in the fermentation of dough to obtain low glucemic index baked products.

—End of the English version—

-----*

LITERATURA CITADA

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2001. Approved Methods of the AACC, St. Paul, MN. 11th Ed.
- Åkerberg A. K. E., H. G. M. Liljeberg, Y. E. Granfeldt, A. W. Drews, and I. M. E. Björck. 1998. An in vitro method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber. *J. Nutr.* 128: 651-660.
- Arendt E. K., L. A. M. Ryan, and F. Dal Bello. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.* 24: 165-174.
- Baena S., C. Jiménez, I. M. Santos, D. Cantero, F. Barja, and I. García. 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochem.* 41: 1160-1164.
- Barros, C., y M. Buenrostro. 2004. Panadería de Tlaxcala ayer y hoy. México D. F., Instituto Tlaxcalteca de Cultura, Gobierno del Estado de Tlaxcala. pp: 5-30.
- Björck I., Y. Granfeldt, H. Liljeberg, J. Tovar, and N. Asp. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 699S-705S.
- Blin, N., and D. W. Stafford. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3: 2303-2308.
- Bozzola, J. J., and L. D. Russell. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists Jones and Bartlett, Boston, U.S.A.* pp: 50-100.
- Carr, F. J., D. Chill, and N. Maida. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281-370.
- Cauvain, S. P., and L. S. Young. 2007. *Fabricación de Pan.* Camden and Chorleywood Food Research Association Zaragoza, Editorial Acribia. pp: 30-54.
- Corsetti A. and L. Settanni. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* 40: 539-558.
- Escalante A., M. A. Elena Rodríguez, A. Martínez, A. N. López-Munguía, F. Bolívar and G. Gosset. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 273-279.
- Escalante A., M. Giles-Gómez, G. Hernández, M. S. Córdova-Aguilar, A. López-Munguía, G. Gosset and F. Bolívar. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124: 126-134.
- Fell J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti, and A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 3: 1351-1371.
- Gänzle M. G., J. Laponen, and M. Gobbetti. 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci. Tech.* 19: 513-521.
- Gofñi I., L. García-Diz, E. Mañas, and F. Saura-Calixto. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chem.* 56: 445-449.
- Gofñi I., A. García-Alonso, and F. Saura-Calixto. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutr. Res.* 17: 427-437.
- Granfeldt Y., I. Björck, A. Drews and J. Tovar. 1992. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 649-660.
- ICUMSA. 1964. Chapter 2 - Determination of reducing sugars. *ICUMSA Methods of Sugar Analysis.* H. C. S. D. Whalley, Elsevier. pp: 13-30.
- Katina K., E. Arendt, K. H. Liukkonen, K. Autio, L. Flander and K. Poutanen. 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci. Tech.* 16: 104-112.
- Kusunose C., T. Fujii, and H. Matsumoto. 1999. Role of starch granules in controlling expansion of dough during baking. *Cereal Chem.* 76: 920-924.
- Lappe O. P., R. T. Moreno, J. G. Arrizón, T. S. Herrera, A. M. García, and A. M. Gschaedler. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8: 1037-1052.
- Liljeberg, H., A. Åkerberg, and I. Björck. 1996. Resistant starch formation in bread as influenced by choice of ingredients or baking conditions. *Food Chem.* 56: 389-394.
- Martín A. M., E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Martínez-Bueno. 2007. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal. Biochem.* 366: 102-104.
- Noriega E., E. Peralta, L. Rivera, and S. Saucedo. 2001. Glycaemic and insulinaemic indices of Mexican foods high in complex carbohydrates in Type 2 diabetic subjects. *Diabetes Nutr. Metab.* 14: 43-50.
- Osorio-Díaz P., J. Tovar, O. Paredes-López, J. A. Acosta-Gallegos, and L. A. Bello-Pérez. 2005. Chemical composition and in vitro starch bioavailability of *Phaseolus vulgaris* (L) cv Mayocoba. *J. Sci. Food Agr.* 85: 499-504.
- Paramithiotis S., S. Gioulatos, E. Tsakalidou, and G. Kalantzopoulos. 2006. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* 41: 2429-2433.
- Ramírez-Chavarín N. L., C. Wachter Rodarte, and M. L. Pérez-Chabela. 2010. Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures. *J. Muscle Foods* 21: 585-596.
- Rollán G., M. De Angelis, M. Gobbetti, and G. F. De Valdez. 2005. Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1495-1502.
- Sanz-Penella J., J. Tamayo-Ramos, and M. Haros. 2012. Application of bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. *Food Bioprocess Tech.* 5: 2370-2380.
- Sampaio J. P., and P. Gonçalves. 2008. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2144-2152.
- Scazzina E., D. Del Rio, N. Pellegrini, and F. Brighenti. 2009. Sourdough bread: Starch digestibility and postprandial glycaemic response. *J. Cereal. Sci.* 49: 419-421.
- Torres-Maravilla E., M. Lenoir, L. Mayorga-Reyes, T. Allain, H. Sokol, P. Langella, M. E. Sánchez-Pardo, and L. Bermudez-Humarán. 2015. Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/s00253-015-7049-4.

- Torres-Rodríguez, I., M. Rodríguez-Alegria, A. Miranda-Molina, M. Giles-Gómez, R. Conca-Morales, A. López-Munguia, F. Bolivar, and A. Escalante. 2014. Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. Springer Plus 3, 583.
- Valadez-Blanco R., G. Bravo-Villa, N. Santos-Sánchez, S. Velasco-Almendarez, and T. Montville. 2012. The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the mexican highlands. Prob. and Antimicrob. Proteins. 4: 140-144.
- Zotta T., A. Ricciardi, and E. Parente. 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. Int. J. Food Microbiol. 115: 165-172.