

00582

7  
281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGÍA  
DEL POZOL

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(ALIMENTOS)

P R E S E N T A :  
MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Gustavo Viniestra González</b>
<b>Primer Vocal</b>	<b>Dr. Miguel Ulloa Sosa</b>
<b>Segundo Vocal</b>	<b>Dr. Sergio Revah Moiseev</b>
<b>Tercer Vocal</b>	<b>Dr. Teófilo Herrera Suárez</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Hermilo Leal Lara</b>
<b>Primer Suplente</b>	<b>Dr. Edgardo Escamilla Marván</b>
<b>Segundo Suplente</b>	<b>Dra. Gloria Soberón Chávez</b>

## **SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.  
Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Reading, Gran Bretaña.

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Eduardo Bárzana García

**SUSTENTANTE:** María del Carmen Wachter Rodarte

**A Paula, Andrés y Tomás  
A la memoria de mi padre  
A mi mamá y hermanos**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Eduardo Bárzana, por su dirección de tesis, excelentes ideas y sugerencias, y su apoyo desinteresado de siempre para lograr las metas académicas.

A David Owens, por su valiosa colaboración en el proyecto, la invitación para realizar parte del proyecto en su laboratorio de la Universidad de Reading y todo tipo de apoyos durante mis estancias en Reading. Por sus útiles ideas y sugerencias durante los viajes de estudio a Chiapas.

A Javier Santís, a la Sra. María y a los demás productores de pozol de los Altos de Chiapas; a la Sra. Mercedes Sánchez de Chávez de Tapachula, por instruirnos sobre el pozol, esperando que algún día puedan aprovechar los resultados de este estudio.

A Cecilia Aguilar y a Noé León, del CIES-San Cristóbal de las Casas, y a Ma. Antonieta Cadena, de la Universidad Autónoma de Chiapas-Tapachula, por las facilidades brindadas para usar sus laboratorios.

La colaboración de Ana Cañas y de Martha Giles y el apoyo técnico de Rocío Santillana.

A Patricia Lappe, a Miguel Ulloa y al maestro Javier Taboada, por el apoyo que siempre me han brindado.

A los miembros del jurado: Dr. Gustavo Viniegra, Dr. Miguel Ulloa, Dr. Sergio Revah, Dr. Teófilo Herrera, Dr. Hermilo Leal, Dr. Edgardo Escamilla y Dra. Gloria Soberón, por sus útiles sugerencias.

A los miembros del Departamento de Alimentos y Biotecnología, por su apoyo.

Al CONACYT, a la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) y al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

Al Consejo Británico, al CONACYT y a la Dirección General de Intercambio Académico de la UNAM por financiar los viajes de intercambio México-Gran Bretaña.

## RESUMEN

Se estudió la microbiología del pozol, bebida ácida de origen maya que se prepara a partir de masa de nixtamal fermentada y que se consume en el sureste de México. Se estudió el pozol de diferentes regiones del estado de Chiapas, en especial el de la zona Altos. Se observaron y monitorearon las metodologías de varios productores familiares y comerciales de esta zona. Se presentan descripciones detalladas de los métodos de elaboración. Se concluyó que existen dos tipos básicos de pozol, el ladino o mestizo y el indígena. El mestizo incluye una etapa adicional de cocción.

En la masa recién preparada se encontraron sistemáticamente bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias del género *Bacillus*, mohos y levaduras. Las cuentas iniciales de estos grupos fueron similares en las masas de diferentes tipos y lotes de pozol. Se aislaron bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas, predominando las del género *Leuconostoc*.

La fermentación ocurre sin adición intencionada de inóculo y durante la molienda de los granos nixtamalizados ocurrió la mayor incorporación de microorganismos. Las cuentas de *Bacillus*, mohos y levaduras fueron mayores en la superficie que en el interior de las masas. Los valores de pH fueron similares en el interior y en la superficie, y a pesar de los valores bajos alcanzados (4.3-4.5) no se inhibieron en forma sensible las enterobacterias ni las bacterias del género *Bacillus*. No existieron grandes diferencias en el crecimiento de cada grupo microbiano en los pozoles indígena y mestizo, aunque las masas indígenas se acidificaron hasta niveles más bajos de pH que las mestizas.

Las bacterias lácticas fueron capaces de desarrollarse en masas esterilizadas por radiación gamma individualmente y en cultivos mixtos. La actividad amilolítica no fue indispensable para crecer y acidificar la masa, pero las cepas amilolíticas produjeron mayor acidez que las no amilolíticas. Las bacterias del género *Leuconostoc* crecieron más

rápidamente que las de *Lactobacillus* al inicio de la fermentación, pero se inhibieron cuando el pH disminuyó a aproximadamente 5. *Lactobacillus* no se inhibió al disminuir el valor de pH de las masas hasta 3.6. Se obtuvieron menores valores de pH con las cepas homofermentativas (3.6 con *L. plantarum* y 4.2 con *Leuconostoc* sp.). Las cepas heterofermentativas produjeron gas y con todas se detectó un aroma frutal en las masas.

Las bacterias lácticas y los contaminantes sobrevivieron durante más tiempo en el pozol, preparado con maíz tratado con calor y álcali (nixtamal), que en una masa no nixtamalizada (*kenkey*). Se observaron valores de pH menores en el *kenkey* que en el pozol durante la fermentación, posiblemente debido a la neutralización de ácidos por los residuos de  $\text{Ca(OH)}_2$  de la nixtamalización en el pozol.

## ABSTRACT

The microbiology of pozol, an acid beverage of Maya origin, prepared with fermented nixtamal (alkali treated maize) dough and consumed in Southeastern Mexico, was studied. Pozol from several regions of the state of Chiapas, and especially from the zone called Altos, was examined. The production processes of several family and commercial producers were observed and monitored. Detailed descriptions of the methods of preparation are presented. It was concluded that there are two main types of pozol, a ladino or mestizo type and an indian type. The mestizo type includes an additional cooking step.

Lactic acid bacteria, enterobacteria, *Bacillus*, moulds and yeasts were present in the freshly prepared dough. The initial concentrations of these microbes were similar in doughs of different types and batches of pozol. Homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria were isolated, with a predominance of *Leuconostoc* strains.

The fermentation occurs without the deliberate addition of inoculum. Incorporation of microbes occurred mainly during the grinding of nixtamal grains. The numbers of *Bacillus*, moulds and yeasts were higher on the surface than in the interior of fermenting doughs. The pH values of interior and surface samples of the doughs were similar. In spite of the low values attained (4.3-4.5), concentrations of Enterobacteriaceae and *Bacillus* bacteria did not decline appreciably during the fermentation. There were no differences in the growth of each microbial group in indian and mestizo pozols, although the indian doughs had lower pH values than the mestizo ones.

In doughs sterilized with gamma radiation, lactic acid bacteria were able to grow individually and in mixed cultures. Amylolytic activity was not essential for growth and acid production in the doughs, but amylolytic lactic acid bacteria produced more acidity



than non-amylolytic strains. *Leuconostoc* sp. grew faster than *Lactobacillus* in the first hours of fermentation, but were inhibited later, when the pH values decreased to approximately 5. *Lactobacillus* was not inhibited when the pH value of the fermenting doughs decreased to 3.6. Lower pH values were attained with homofermentative strains (3.6 with *L. plantarum* and 4.2 with *Leuconostoc* sp.). Gas was produced by the heterofermentatives and a fruity aroma was detected in the doughs in both cases.

Lactic acid and contaminant bacteria survived longer in pozol, prepared with heat and alkali treated maize (nixtamal), than in dough prepared with a non-nixtamalized maize (*kenkey*). Lower pH values were observed in *kenkey* than in pozol during fermentation, possibly because of neutralization of acids by residual  $\text{Ca(OH)}_2$  from nixtamalization in pozol.

# CONTENIDO

## RESUMEN

## ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES.....	3
1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES.....	3
1.2 ALIMENTOS FERMENTADOS MEXICANOS.....	4
1.2.1 El pozol.....	5
Elaboración del pozol.....	6
Microbiología.....	6
Estudios químicos y nutricionales.....	11
Estudios en condiciones controladas.....	11
1.3 LAS BACTERIAS EN LOS ALIMENTOS FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL.....	12
1.3.1 Ecología microbiana de plantas.....	12
1.3.2 Bacterias lácticas.....	12
Bacterias lácticas amilolíticas.....	15
1.3.3 Enterobacterias.....	17
1.3.4 <i>Bacillus</i> .....	19
1.4 CULTIVOS MIXTOS.....	20
1.4.1 Eliminación de microorganismos contaminantes en fermentaciones lácticas.....	21
1.4.2 Seguridad microbiológica de alimentos fermentados.....	23
1.4.3 Desarrollo de cultivos iniciadores para alimentos fermentados tradicionales.....	28
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	30
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	32
3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	32
3.1.1 Cuenta viable de bacterias lácticas.....	32
3.1.2 Cuenta viable de bacterias mesófilas no lácticas.....	32
3.1.3 Cuenta viable de enterobacterias.....	33
3.1.4 Cuenta viable de mohos y levaduras.....	33
3.1.5 Cuenta microscópica por el método de Breed.....	33
3.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	34
3.2.1 Aislamiento y purificación.....	34

3.2.2	Conservación de las cepas.....	34
3.2.3	Caracterización de bacterias lácticas.....	35
	Tinción de Gram y prueba de catalasa.....	35
	Producción de CO <sub>2</sub> a partir de glucosa.....	35
	Producción de dextrana a partir de sacarosa.....	36
	Hidrólisis de almidón.....	36
3.2.4	Caracterización de enterobacterias.....	36
	Tinción de Gram y prueba de oxidasa.....	36
	Identificación utilizando el sistema API 20E.....	36
3.2.5	Caracterización de bacterias mesófilas no lácticas.....	37
	Tinción de Gram y prueba de la catalasa.....	37
3.3	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....	38
3.3.1	Determinación de humedad.....	38
3.3.2	Determinación de pH.....	38

## **CAPÍTULO 4: CARACTERÍSTICAS Y MICROBIOLOGÍA DE POZOLES TRADICIONALES..... 40**

### **4.1 CARACTERÍSTICAS DEL POZOL..... 40**

#### **4.1.1. EVALUACIÓN SUBJETIVA DE POZOLES DE DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE CHIAPAS..... 41**

4.1.1.1 Materiales y métodos..... 41

4.1.1.2 Resultados y discusión..... 41

4.1.1.3 Conclusión..... 45

#### **4.1.2. LA ELABORACIÓN DE POZOL EN LOS ALTOS DE CHIAPAS..... 45**

4.1.2.1 Introducción..... 45

    La región de estudio..... 45

    Tipos de productores..... 46

4.1.2.2 Materiales y métodos..... 47

4.1.2.3 Resultados y discusión..... 48

    Consideraciones socioculturales..... 48

    La materia prima: el maíz..... 48

    Etapas de elaboración del pozol..... 50

        Limpieza del maíz..... 50

        Nixtamalización..... 50

        Lavado del nixtamal..... 51

        Segunda cocción o "reventado"..... 51

        Remojo..... 53

        Molienda..... 54

        Elaboración de la bola..... 55

        Envoltura..... 55

        Fermentación..... 56

El producto final.....	58
Concepto empírico de calidad.....	58
Consumo de pozol.....	58
4.1.2.4 Conclusiones.....	59
<b>4.2 MICROBIOLOGÍA DEL POZOL.....</b>	<b>60</b>
4.2.1 Introducción.....	60
4.2.2 Materiales y métodos.....	60
4.2.3 Resultados.....	64
4.2.3.1 Números de microorganismos en las masas recién elaboradas.....	64
4.2.3.2 Caracterización de las bacterias del pozol.....	66
Bacterias lácticas.....	66
Enterobacterias.....	66
Bacterias mesófilas aerobias no lácticas.....	67
4.2.4 Discusión.....	70
4.2.4.1 Números de microorganismos presentes en masas recién elaboradas.....	70
4.2.4.2 Caracterización de las bacterias del pozol.....	71
Bacterias lácticas.....	71
Enterobacterias.....	72
Bacterias mesófilas aerobias no lácticas.....	74
4.2.5 Conclusiones.....	74
<b>CAPÍTULO 5: INCORPORACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL POZOL.....</b>	<b>76</b>
5.1 Introducción.....	76
5.2 Materiales y métodos.....	76
5.2.1 Diseño experimental.....	76
5.2.2 Preparación de pozol estándar por el método tradicional.....	77
5.2.3 Preparación de pozol de nixtamal sujeto a una etapa adicional de cocción.....	77
5.2.4 Muestreo.....	79
5.2.5 Determinación de poblaciones microbianas.....	80
5.3 Resultados.....	85
5.3.1 Desarrollo de microorganismos en el pozol estándar.....	85
5.3.2 Efecto del remojo en la microbiota.....	85
5.3.3 Efecto de la molienda en la microbiota.....	88
5.3.4 Efecto de la superficie de preparación en la microbiota.....	88
5.3.5 Efecto de la microbiota del aire.....	91
5.3.6 Crecimiento durante la incubación.....	91
5.4 Discusión.....	92
5.4.1 Fuentes de microorganismos en el pozol.....	92
5.4.2 Preparación del pozol de calidad microbiológica aceptable.....	92
5.5 Conclusiones.....	93

**CAPÍTULO 6: MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN EN POZOLES TRADICIONALES..... 95**

6.1	Introducción.....	95
6.2	Materiales y métodos.....	96
6.2.1	Diseño experimental.....	96
6.2.2	Muestreo.....	96
6.2.3	Determinación de poblaciones microbianas.....	97
6.2.4	Determinaciones de pH y humedad.....	97
6.3	Resultados.....	97
6.3.1	Dinámica de crecimiento microbiano.....	97
	Bacterias lácticas.....	97
	Bacterias mesófilas no lácticas.....	97
	Enterobacterias.....	98
	Mohos y levaduras.....	98
6.3.2	Cambios de pH en las masas.....	98
6.3.3	Contenido de humedad inicial y apariencia de las masas.....	100
6.4	Discusión.....	104
6.4.1	Cambios en las poblaciones microbianas.....	104
6.4.2	Diferencias en el desarrollo microbiano entre las masas mestiza e indígena.....	105
6.4.3	Diferencias en el desarrollo microbiano entre el interior y la superficie de las masas.....	106
6.4.4	Cambios de pH durante la fermentación.....	108
6.4.5	Seguridad microbiológica del pozol.....	110
6.5	Conclusiones.....	112

**CAPÍTULO 7: MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN EN UN SISTEMA ASÉPTICO..... 114**

7.1	Introducción.....	114
7.2	Materiales y métodos.....	116
7.2.1	Diseño experimental.....	116
7.2.2	Microorganismos.....	116
7.2.3	Sistema de fermentación.....	117
	Preparación de la masa de nixtamal.....	117
	Preparación de la masa de <i>kenkey</i> .....	117
	Esterilización de la masa.....	117
	Preparación del inóculo.....	117
	Inoculación.....	118
	Fermentación.....	118
7.2.4	Análisis microbiológicos.....	121
	Preparación de la muestra.....	121

Cuenta viable de bacterias lácticas.....	121
Cuenta viable de bacterias contaminantes.....	123
Cuenta viable de mohos y levaduras.....	123
7.2.5 Análisis fisicoquímicos.....	124
Contenido de humedad.....	124
Actividad de agua.....	124
pH.....	124
Acidez titulable.....	124
7.3 Resultados.....	125
<b>7.3.1 Experimento 1: Crecimiento de las cepas puras de bacterias lácticas en nixtamal estéril.....</b>	<b>125</b>
Objetivos.....	125
Características de la masa.....	125
Crecimiento microbiano.....	125
Cambios en los valores de pH y de acidez titulable durante la fermentación.....	126
Cambios en la apariencia de las masas.....	127
Reproducibilidad de las fermentaciones.....	127
<b>7.3.2 Experimento 2: Crecimiento de las cepas de bacterias lácticas en cultivo puro y mixto, en nixtamal estéril y no estéril.....</b>	<b>130</b>
Objetivos.....	130
Características de la masa.....	130
Crecimiento microbiano.....	130
Cambios en los valores de pH y de acidez titulable durante la fermentación.....	131
Apariencia de las masas.....	132
<b>7.3.3 Experimento 3: Efecto de la nixtamalización en el crecimiento microbiano de las masas de maíz.....</b>	<b>137</b>
Objetivo.....	137
Características de la masa.....	137
Crecimiento microbiano.....	137
Cambios en los valores de pH y de acidez titulable durante la fermentación.....	138
Apariencia de las masas.....	138
7.4 Discusión.....	143
7.4.1 Importancia de la actividad amilolítica de las bacterias lácticas en la fermentación del pozol.....	143
7.4.2 Diferencias en el crecimiento y modificación de la masa entre cultivos puros de cepas homo y heterofermentativas de bacterias lácticas y cultivos mixtos de las mismas.....	146

7.4.3 Efecto de la nixtamalización en el desarrollo de las bacterias lácticas y de las bacterias contaminantes.....	148
7.5 Conclusiones.....	149
<b>CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>CAPÍTULO 9: REFERENCIAS.....</b>	<b>157</b>
<b>APÉNDICE 1: Características de las bacterias lácticas de los pozoles de Tapachula.....</b>	<b>169</b>
<b>APÉNDICE 2: Características de las bacterias lácticas de los pozoles de San Cristóbal de las Casas.....</b>	<b>171</b>
<b>APÉNDICE 3: Pruebas bioquímicas de las enterobacterias aisladas del pozol, realizadas con el kit API20E.....</b>	<b>172</b>
<b>APÉNDICE 4: Identificación de las enterobacterias aisladas del pozol, mediante el kit API20E.....</b>	<b>173</b>
<b>APÉNDICE 5: Características de las cepas de bacterias lácticas seleccionadas, aisladas del pozol e identificadas por Nuraida (1988).....</b>	<b>174</b>

# LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b>	Algunos alimentos fermentados mexicanos de maíz.....	7
<b>Tabla 3.1</b>	Tabla de identificación, para la interpretación de resultados del sistema API 20E.....	39
<b>Tabla 4.1</b>	Características de muestras de pozoles de diferentes zonas del estado de Chiapas.....	42
<b>Tabla 4.2</b>	Características de las bacterias lácticas aisladas del pozol.....	68
<b>Tabla 4.3</b>	Enterobacterias aisladas del pozol.....	69
<b>Tabla 5.1</b>	Concentraciones de microorganismos presentes en diferentes etapas durante la producción de pozol por el procedimiento tradicional.....	86
<b>Tabla 5.2</b>	Concentraciones de microorganismos presentes en diferentes etapas durante la producción de pozol por un procedimiento modificado con una cocción adicional de los granos de nixtamal después del remojo.....	89
<b>Tabla 5.3</b>	Números de microorganismos en bolas de pozol elaboradas por diferentes métodos.....	90
<b>Tabla 6.1</b>	Cuentas de mohos y de levaduras en el interior y en la superficie de pozoles mestizos e indígenas.....	102



# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 4.1</b>	Regiones geográfico-políticas de Chiapas.....	52
<b>Figura 4.2</b>	Lavado de nixtamal en un río.....	52
<b>Figura 4.3</b>	Molienda de nixtamal en molino de mano, proceso indígena.....	57
<b>Figura 4.4</b>	Pozol indígena envuelto en hojas de plátano.....	57
<b>Figura 4.5</b>	Procesos indígena y mestizo de elaboración de pozol en San Cristóbal de las Casas.....	62
<b>Figura 4.6</b>	Proceso mestizo de elaboración de pozoles blanco y de cacao en Tapachula.....	63
<b>Figura 4.7</b>	Cuentas iniciales de bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas, enterobacterias, mohos y levaduras en masas recién moldeadas de pozoles indígena y mestizo de San Cristóbal y blanco y de cacao de Tapachula.....	65
<b>Figura 5.1</b>	Diseño experimental para identificar las fuentes de contaminación microbiana en la masa de pozol.....	78
<b>Figura 5.2</b>	Cocción en agua con cal de los granos de maíz, en la casa del productor.....	81
<b>Figura 5.3</b>	Lavado de los granos de nixtamal, en la casa del productor.....	81
<b>Figura 5.4</b>	Molino comercial de nixtamal.....	82
<b>Figura 5.5</b>	Moldeado de la masa sobre la mesa de madera, en la casa del productor.....	82
<b>Figura 5.6</b>	Moldeado en mesa cubierta con plástico limpio, usando guantes de plástico, en la casa del productor.....	83
<b>Figura 5.7</b>	Molienda con molino manual, mesa cubierta con plástico limpio y usando guantes de plástico, en la casa del productor.....	83
<b>Figura 5.8</b>	Molienda aséptica en el laboratorio, evitando cualquier tipo de contaminación.....	84

de contaminación.....	84
<b>Figura 5.9</b> Espacios muertos del molino comercial, donde se acumula la masa que sirve como fuente de inóculo.....	84
<b>Figura 5.10</b> Cambios en los valores de pH de bolas de pozol elaboradas por diferentes métodos.....	87
<b>Figura 6.1</b> Fermentación de masas preparadas por el método indígena y por el método mestizo. Crecimiento de bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas y valores de pH, en la superficie y en el interior de las masas.....	99
<b>Figura 6.2</b> Fermentación de masas preparadas por el método indígena y por el método mestizo. Crecimiento de enterobacterias y valores de pH en la superficie y en el interior de las masas.....	101
<b>Figura 6.3</b> Fermentación de masas preparadas por el procedimiento indígena y por el procedimiento mestizo, incubadas a 28°C. Valores de pH de la superficie y del interior de las masas.....	103
<b>Figura 6.4</b> Valores de pH del interior de masas preparadas por el método indígena y por el método mestizo, incubadas a temperatura ambiente de invierno.....	103
<b>Figura 7.1</b> Diagrama de flujo de la elaboración de masa de <i>kenkey</i> .....	119
<b>Figura 7.2</b> Sistema de fermentación modelo del pozol.....	120
<b>Figura 7.3</b> Apariencia de las colonias de las tres cepas de bacterias lácticas utilizadas en agar Rogosa y agar para <i>Leuconostoc</i> .....	122
<b>Figura 7.4</b> Crecimiento de bacterias lácticas y pH de las masas inoculadas con <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva y <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa, en cultivo puro, en nixtamal esterilizado.....	128
<b>Figura 7.5</b> Cambios en la acidez titulable de masas inoculadas con <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positivo y <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativo, en cultivo puro, en nixtamal esterilizado.....	129
<b>Figura 7.6</b> Crecimiento de: <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva y <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa en cultivo puro, en nixtamal esterilizado, y pH de las masas.....	133

<b>Figura 7.7</b> Fermentación de nixtamal esterilizado, inoculado con un cultivo mixto de bacterias lácticas. Crecimiento de: <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva, <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa y pH de las masas.....	134
<b>Figura 7.8</b> Fermentación de nixtamal no esterilizado, inoculado con un cultivo mixto de bacterias lácticas. Crecimiento de: <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva, <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa, bacterias contaminantes, y pH de las masas.....	135
<b>Figura 7.9</b> Fermentación de nixtamal esterilizado y no esterilizado, inoculados con los cultivos puros y el cultivo mixto de bacterias lácticas. Cambios en los valores de acidez titulable.....	136
<b>Figura 7.10</b> Fermentaciones de masas de <i>kenkey</i> y de pozol esterilizadas, inoculadas con el cultivo mixto de bacterias lácticas. Crecimiento de: <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva, <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa y pH de las masas.....	139
<b>Figura 7.11</b> Fermentación de la masa de <i>kenkey</i> no esterilizada, inoculada con el cultivo mixto de bacterias lácticas. Crecimiento de: <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i> amilasa positiva, <i>Leuconostoc</i> sp. amilasa negativa y pH de las masas.....	140
<b>Figura 7.12</b> Fermentaciones de masas de <i>kenkey</i> y de pozol no esterilizadas, inoculadas con el cultivo mixto de bacterias lácticas. Crecimiento de bacterias contaminantes y pH de las masas.....	141
<b>Figura 7.13</b> Fermentación de masas de pozol y de <i>kenkey</i> , esterilizadas y sin esterilizar, inoculadas con el cultivo mixto de bacterias lácticas. Cambios en los valores de pH y de acidez titulable de las masas.....	142

# INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida que se prepara a partir de masa de nixtamal fermentada en estado semisólido. Es de origen maya y se ha consumido en el sureste de México desde épocas prehispánicas. El proceso de fermentación es complejo, ya que al ocurrir en forma natural, sin inoculación, como la mayoría de los alimentos de origen antiguo, involucra una microbiota mixta. La composición del sustrato, la masa de nixtamal, también es compleja, al incluir varios tipos de sustancias (carbohidratos simples y complejos, grasas, proteínas, fibra) susceptibles de degradación microbiana. Además, al fermentarse en forma semisólida, presenta heterogeneidad en cuanto al grado de aireación y a la composición química, lo cual posiblemente da lugar a la formación de microambientes.

En 1955, Cravioto y col. determinaron que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptófano que el maíz y que la concentración de la proteína del pozol es mayor que la del maíz y de mejor calidad. Herrera, Ulloa, Taboada y colaboradores han realizado estudios extensos sobre la micología de la fermentación, así como sobre el fenómeno de fijación de nitrógeno que se presenta en la misma. Estos constituyen la mayor parte de los estudios reportados sobre este alimento y fueron resumidos por Ulloa y col. (1987). En contraparte, las bacterias que participan en esta fermentación han sido poco estudiadas.

El propósito de este estudio es avanzar en el conocimiento sobre las propiedades y actividades de los microorganismos, en especial las bacterias, en este ambiente natural.

La ecología microbiana, la fisiología y la taxonomía son tres aspectos importantes de la microbiología. La ecología microbiana se define como la interacción de microorganismos

con su ambiente fisicoquímico y con otros micro o macroorganismos presentes en él; la fisiología se define como las funciones y procesos vitales de las células microbianas, incluyendo su nutrición, metabolismo, crecimiento, etc., y la taxonomía es la ciencia de la clasificación, las leyes y los principios que cubren la clasificación de los microorganismos (Trüpper, 1993). En este trabajo se incluyen experimentos relacionados con estos tres aspectos de la microbiología, que están íntimamente relacionados.

Debido a la naturaleza diferente de los experimentos realizados, la organización de la tesis es como sigue: en el primer capítulo se presentan las generalidades y en el segundo los objetivos del trabajo. Estos objetivos se plantean en términos del trabajo global. Los capítulos 4 al 7 cubren temáticas distinguibles que por su importancia son presentados de manera independiente, según se describe a continuación. Por ello, cada uno inicia con los objetivos particulares de dichas temáticas. En el tercero se presentan los materiales y métodos generales. La parte experimental se dividió en 4 capítulos. La mayor parte del trabajo incluyó estudios de campo, realizados entre diciembre de 1989 y abril de 1991 (capítulos 4, 5 y 6). En el capítulo 4 se presentan las características y la microbiología de pozoles tradicionales, en el 5 la incorporación de los microorganismos durante la elaboración de la masa, y en el 6 la dinámica del crecimiento microbiano durante la fermentación de pozoles tradicionales. El capítulo 7 incluye el uso de un modelo experimental con el que se realizaron fermentaciones controladas en el laboratorio. Las conclusiones generales y las referencias son los capítulos 8 y 9, respectivamente.

# Capítulo 1

## GENERALIDADES

### 1.1 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de los microorganismos. Existe una gran variedad de este tipo de alimentos en el mundo. Algunos de ellos, como: la cerveza, el vino, el vinagre, los quesos y el pan, han sido extensamente estudiados y se consumen en cualquier parte del mundo. Existen, sin embargo, un gran número de alimentos fermentados que se producen en forma regional y que no se conocen fuera de su lugar de origen. Estos alimentos forman parte importante de la dieta de muchos grupos étnicos, los cuales los han consumido desde tiempos inmemoriales. De hecho, como menciona Steinkraus (1989), los microorganismos y las reacciones químicas que ocurren en los alimentos fermentados ya estaban presentes en la Tierra cuando el hombre evolucionó.

Los métodos tradicionales de producción de estos alimentos son sencillos, económicos, no requieren equipo complicado y utilizan materias primas disponibles y de bajo costo. Por medio de estos procedimientos se producen sabores, aromas y texturas agradables que proporcionan variedad a la dieta; conservan los productos animales y vegetales y además, pueden destruir factores antinutricionales, mejorando su valor nutritivo. Incluso, en muchos casos, reduciendo el tiempo de cocción, lo que representa un ahorro de energía (Hesseltine y Wang, 1979).

Según Hesseltine y Wang (1986) existe una tendencia en el aumento del uso de alimentos fermentados, y dentro de los factores que la han provocado se mencionan a la protección contra microorganismos patógenos y al aumento en la vida de anaquel, logrados por la fermentación; al aumento en el consumo de alimentos de origen vegetal y el interés por la alimentación natural; al incremento en el interés científico en este tipo de alimentos; a

motivos culturales y religiosos y a los movimientos de migración, en los que existe la oportunidad de que estos alimentos se diseminan a diversas regiones del mundo. Sin embargo la mayoría de los alimentos fermentados se producen a nivel casero o a pequeña escala; en muchas ocasiones con malas condiciones higiénicas, o con calidad excesivamente variable. Debido a ésto, es importante la investigación relacionada con los alimentos fermentados tradicionales, para obtener productos consistentes y de buena calidad higiénica a nivel rural, o incluso, para industrializarlos y expandir su distribución, para utilizarlos en el desarrollo de nuevos productos o para aprovechar las características especiales de su microbiota en otros procesos.

## **1.2 ALIMENTOS FERMENTADOS MEXICANOS**

Como señala Vargas (1993a), México es uno de los países más pródigos en recursos minerales, vegetales y animales propios para consumo humano, que han sido explotados desde la llegada del hombre a nuestro continente. Así, las cocinas indígenas actuales y del pasado se han caracterizado por el uso de la gran variedad de recursos naturales locales y sus técnicas culinarias, han sido el resultado de una larga adaptación cultural al medio ambiente. De acuerdo con el mismo autor, los estudios arqueológicos y otras fuentes históricas muestran que los recursos del México prehispánico eran tan ricos y variados que la alimentación era muy completa, por lo que concluye que las cocinas indígenas son una fuente de recursos aprovechables para la alimentación nacional, que aún no se conoce ni se ha explotado de manera suficiente.

Antes de la llegada de los españoles coexistían en México grupos muy diversos, que mantuvieron su identidad aunque intercambiaron muchos rasgos culturales. De esta forma asimilaron las novedades que aprendían de los grupos con los que se relacionaron, incluyendo los conquistadores. Como los diversos grupos étnicos no son reliquias del pasado, ni se encuentran "congelados" culturalmente, no existe una sola dieta indígena,

pero existen elementos comunes a la mayoría, como el uso del frijol, el chile y el maíz (Vargas, 1993b).

Dentro de la gran variedad de los procedimientos culinarios, originarios de México, la fermentación es una técnica importante de preparación de los alimentos. Eso se puede corroborar porque las bebidas y los alimentos fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de los numerosos grupos indígenas de México desde la época prehispánica. Inclusive algunos de estos productos fermentados han sido aceptados por grupos mestizos, en ocasiones por criollos y por inmigrantes recientes. Además de su uso alimenticio, estos productos fermentados a veces se usan con fines medicinales, estimulantes y rituales (Herrera, 1993).

Existen muchos tipos de alimentos fermentados, pero al ser el maíz la base de la alimentación de los pueblos mesoamericanos, la mayoría de los alimentos fermentados se preparan a base de este cereal. Casillas y Vargas (1984) reportan que aunque no todos los alimentos fermentados son de origen prehispánico, la idea de fermentar el maíz sí parece serlo. En la Tabla 1.1 se presenta una lista de alimentos fermentados de maíz. De los nueve productos fermentados en dicha tabla, seis son de tipo agrio (ácido) y no embriagantes, entre los cuales se incluye el pozol, objeto de este trabajo.

### **1.2.1 El pozol**

El pozol, cuyo nombre viene de la palabra *pozolli*, que significa espumoso en náhuatl, es una masa de maíz fermentada moldeada en forma de bolas de diferentes geometrías y tamaños, de 10 a 12 cm de largo y 5 a 8 cm de ancho, y que pesan entre 70 y 170 g, aunque algunas pueden pesar hasta 1 Kg o más. Es consumido por poblaciones indígenas y mestizas del sureste de México, incluyendo los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatán, y en menor escala Veracruz y Oaxaca. Los chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolabales, chamulas, mames, zoques y zapotecos de estas regiones han utilizado esta bebida con fines alimenticios, ceremoniales y curativos desde épocas



prehispánicas (Ulloa y col., 1983). También se llama pozole al guisado con maíz desollejado y en caldo con granos reventados que parecen espuma, pero que es completamente distinto de la bebida fermentada objeto de esta tesis.

**Elaboración del pozol.** De acuerdo con Ulloa y col. (1983), la técnica de preparación del pozol, que se ha transferido de una generación a otra para el consumo familiar o a escala comercial pequeña, es la siguiente:

El maíz, de preferencia blanco, se desgrana y se hierven entre 0.5 y 1 Kg de granos en 2 litros de agua con un puñado de cal (aproximadamente 10% de  $\text{Ca(OH)}_2$  p/v) durante aproximadamente 1 hora. Cuando los granos se hinchan y se pueden desprender fácilmente los pericarpios, se enfrían y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se les llama nixtamal<sup>1</sup>. Se muelen en un molino metálico para obtener una masa martajada, que se moldea manualmente en forma de bolas. Éstas se envuelven en hojas de plátano para evitar su desecación y se fermentan de 1 a 14 días o más, dependiendo de las preferencias del consumidor.

En el estado de Tabasco se añade cacao molido a la masa antes de la fermentación y a este tipo de pozol se le llama chorote.

**Microbiología.** Ulloa (1974) estudió la sucesión de hongos y levaduras en muestras de pozol de Tabasco, observando que *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium moniliforme* presentes en los granos de maíz se destruyen durante el tratamiento con cal y calor. *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida* (*Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*) se encuentran en pozoles con pocas horas de fermentación, mientras

---

<sup>1</sup> Del azteca *nextli*, ceniza, y *tamalli*, tamal (Santamaría, 1978). La etimología sugiere que el método antiguo requería cenizas en vez de cal. De cualquier forma se emplean álcalis para hacerle soltar el hollejo.

**Tabla 1.1** Algunos alimentos fermentados mexicanos de maíz

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ESTADOS DONDE SE CONSUME
Agua agria (a)	Bebida no embriagante preparada con maíz molido, mezclado con agua y fermentado.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.
Atole (a) (del azteca <i>atl</i> , agua; <i>olli</i> , líquido viscoso o hule (e, f))	Bebida no embriagante preparada con masa de maíz o tortillas y mazorcas.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Atole agrio (a, d)	Bebida no embriagante preparada con maíz negro hecho masa y fermentado durante 4 o 5 días.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Pozol (a, d) (del azteca <i>pozolli</i> , espumoso (g))	Bebida ácida no embriagante, preparada diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado.	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Quintana Roo.
Sendechó (a)	Bebida alcohólica (especie de cerveza), preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con "chiles colorados". La harina se mezcla con agua para formar un atole, que se hierva, se cuele, se enfría, se le añade el fermento y se deja fermentar. El fermento se prepara a partir de un sendechó anterior.	Estado de México.
Tepache (a) (del azteca <i>tepiatl</i> , bebida de maíz (f))	Bebida alcohólica preparada con granos de maíz y piloncillo o panela, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua.	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.

Continuación Tabla 1.1

NOMBRE.	DESCRIPCIÓN	ESTADOS DONDE SE CONSUME
<p>Tesgüino (a) (del azteca <i>tecuin</i>, latir el corazón (f, g))</p>	<p>Bebida semejante a la cerveza, preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con "catalizadores", que son fragmentos de plantas existentes en la región donde se elabora.</p>	<p>Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco.</p>
<p>Tamal agrio (b, d) (del azteca <i>tamalli</i>, etimología desconocida (e,f))</p>	<p>Tamales elaborados con masa fermentada durante aproximadamente 20 horas. El <i>xokotamal</i>, que contiene únicamente masa y el <i>etixtamal</i>, que contiene frijol negro se envuelven en hojas de maíz y el <i>xokotamal piksa</i> se cocina con frijol gordo tierno y se envuelve en hoja de <i>moxte</i>.</p>	<p>Puebla: Cuetzalan.</p>
<p>Tortilla agria (c, d)</p>	<p>Se cuece el maíz con cal y se deja toda la noche sobre la candela. Ya frío se lava y se muele. La masa se reposa de medio a un día y con la masa aceda se hacen las tortillas.</p>	<p>Quintana Roo, Yucatán.</p>

- (a) De Cruz Ulloa y Ulloa, 1973
- (b) De Valderrama y Ramírez, 1993
- (c) De Nieto y Vázquez, 1993
- (d) Escamilla y col., 1991
- (e) Robelo, 1904
- (f) Santamaría, 1978
- (g) Robelo, 1948

que *Cladosporium cladosporioides* o *C. herbarum*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus* o *Mucor racemosus* aparecen en el pozol cuando su superficie se va secando y su pH va disminuyendo. Se aislaron también las levaduras *Hansenula fabianii*, *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, y los mohos *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium lanosoviride*, *Phialophora richardsiae*, *Rhizopus nigricans* y *Trichoderma viride*.

Las bacterias del pozol han sido poco estudiadas. Salinas (1958), en el primer estudio microbiológico del pozol, aisló *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum (Citrobacter) aerogenoides*. Ulloa y Herrera (1972) aislaron del pozol *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter (Alcaligenes) pozolis*. *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)*, que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Taboada y col., 1975). *A. azotophilum* presenta también antagonismo sobre varias especies de bacterias, levaduras y mohos (Herrera y Ulloa, 1975). Fuentes, Herrera y Ulloa (1974) aislaron *Pseudomonas mexicana* y *Escherichia coli* var. *neapolitana*.

Steinkraus (en Ulloa y col., 1983) infiere que durante las primeras horas de fermentación predominan las bacterias lácticas y que quizás son las responsables de la producción del ácido láctico durante las primeras horas de fermentación. Esto fue confirmado por Silva-Villarreal (1984), Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988), Ramírez (1987) y Nuraida (1988).

Silva-Villarreal (1984) encontró incrementos de 4 a 5 veces en la acidez (en base seca) de pozoles de Tapachula durante las primeras 48 horas de fermentación. Relacionó este incremento con la presencia de bacterias lácticas, de las que aisló *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* en las primeras etapas de fermentación. Mozqueda-González y Escamilla Hurtado (1988) observaron que durante la fermentación de pozol tipo mestizo (con dos cocciones) realizado en su laboratorio, la cuenta total de microorganismos viables aumentó de  $10^6$  -  $10^7$  a  $10^9$  por gramo de muestra fresca ( con 69% de humedad).

Después de 48 horas las bacterias Gram negativas prácticamente desaparecieron, las levaduras se estabilizaron en el nivel de  $10^7$  ufc/g y las bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos) iniciaron un ascenso que después de 60 horas llegó hasta  $10^9$ /g. Estos cambios se asociaron a una disminución progresiva del pH de un valor inicial de 6.9 hasta 3.8 después de 98 horas, junto con una importante elevación de ácido láctico, que llegó hasta 1.5 g/g de sólidos y con una notable elevación equivalente de la acidez titulable. Ramírez (1987) realizó aislamientos microbianos de pozoles de Yucatán, Campeche, Tabasco y Chiapas, encontrando durante los primeros 5 días de fermentación grupos bacterianos primero y después grupos fungales. Los grupos bacterianos incluían: bacterias Gram negativas, catalasa positivas; bacterias Gram positivas, catalasa negativas y bacterias móviles Gram negativas fijadoras de nitrógeno. Nuraida (1988) caracterizó bacterias lácticas aisladas por Owens y Wacher en 1987 de pozoles de Chiapas. Las siguientes bacterias se aislaron en un intervalo de 6 días de fermentación: *Leuconostoc spp.*, presente durante todo el tiempo de fermentación estudiado; *Lactobacillus spp.* heterofermentativos y *Streptococcus spp.* en etapas tempranas y *Lactobacillus spp.* homofermentativos en etapas tardías de la fermentación. Las especies aisladas fueron: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus (Lactococcus) lactis* y *Streptococcus (Lactococcus) raffinolactis*.

Estas (Silva-Villarreal, 1984; Ramírez, 1987; Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado, 1988 y Nuraida, 1988) son evidencias directas de que el pozol es fundamentalmente una fermentación láctica del maíz. También sugieren la naturaleza mixta de esta fermentación por la persistencia de mohos y levaduras a lo largo de dicho proceso.

El trabajo de Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988) presenta datos que sugieren cierto antagonismo entre las bacterias lácticas y las Gram negativas, muchas de las cuales podrían ser enterobacterias.

**Estudios químicos y nutricionales.** Durante la fermentación se desarrolla un sabor ácido y un aroma característico que le imparten a la bebida propiedades refrescantes. El pH de los granos es de 5.7 y aumenta durante la nixtamalización a 7.5. La masa tiene un pH inicial de 6.8 y disminuye a 3.9 en el octavo día de fermentación. El contenido de humedad es de 30% (Ulloa, 1974).

Cravioto y col. (1955) analizaron el pozol y los granos de maíz utilizados en su preparación, encontrando que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptofano que el maíz. La concentración de proteína es mayor y ésta es de mejor calidad en el pozol que en el maíz. Ramírez (1987) detectó un aumento en las concentraciones de lisina, triptofano y niacina después de 10 días de fermentación.

**Estudios en condiciones controladas.** Ramírez (1987) realizó fermentaciones de masa de nixtamal inoculada con cultivos puros y mixtos de *Lactobacillus* sp., *Agrobacterium azotophilum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida tropicalis* y *Geotrichum candidum*, en un fermentador adiabático. Determinó las curvas de evolución de calor durante la fermentación, encontrando que existen 3 velocidades de crecimiento secuenciales, que se interpretaron como una fermentación con procesos debidos a una sucesión fermentativa. Con los cultivos mixtos (que incluían las bacterias, mohos y levaduras mencionados anteriormente) y los bacterianos (cultivo mixto de *A. azotophilum* y *Lactobacillus* sp.) se obtuvieron cambios de acidez, presencia de aroma frutal y una textura esponjosa en las masas.

El mismo autor inoculó masas esterilizadas con óxido de etileno con bacterias fijadoras de nitrógeno y un inóculo mixto. El efecto neto del inóculo mixto después de 10 días de fermentación fue la acidificación de la masa, la producción de un aroma frutal y el aumento en la concentración de la niacina; la calificación química no se modificó. Él concluyó que en las primeras 72 horas ocurre una fermentación láctica y posteriormente

se presenta una interrelación compleja de la microbiota que da como resultado la producción del aroma y sabor característicos del pozol.

### **1.3 LAS BACTERIAS EN LOS ALIMENTOS FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL**

#### **1.3.1 Ecología microbiana de plantas**

Cada tipo de organismo vegetal o sus derivados constituyen un ambiente único para el establecimiento de determinados grupos microbianos. Esto depende del tipo de microorganismos competidores, las sustancias antagonistas que se encuentren naturalmente presentes en el material de cultivo, el tipo, concentración y disponibilidad de nutrientes y los factores físicos. La microbiota de las plantas se desarrolla en sus superficies y dentro de ésta predominan las bacterias Gram negativas y las Gram positivas esporuladas, incluyendo números bajos de mohos y levaduras. Durante la cosecha, al aumentar la disponibilidad de nutrientes, se incrementan los números de estos microorganismos. Las bacterias aerobias Gram negativas son reemplazadas por bacterias anaerobias o anaerobias facultativas Gram positivas de los géneros: *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* (Daeschel y col., 1987). Así, se pueden encontrar como microbiota natural de las plantas a las bacterias lácticas, bacterias mesófilas aerobias y anaerobias, bacterias Gram negativas como las enterobacterias, los mohos y las levaduras. Es común entonces encontrar en los alimentos fermentados de origen vegetal a todos estos grupos microbianos.

#### **1.3.2 Bacterias lácticas**

Los números de bacterias lácticas en las plantas son normalmente muy pequeños y variables. Daeschel y col. (1987) reportan que en general oscilan entre 10 y 1,000 por

gramo, lo cual representa entre el 0.01 y 1 % del total de la población microbiana. En la producción de ensilados de maíz el número de bacterias lácticas en el material vegetal es de  $10^1$  a  $10^5$  ufc/g (Chunjian y col., 1992); la fermentación de atoles de cereales como el *uji* de Kenya inicia con cuentas de menos de 10 lactobacilos por gramo en la harina de maíz utilizada (Gatumbi y col., 1983).

Es común que los grupos que dominan (en cuanto a número) al inicio de la fermentación sean las enterobacterias u otros microorganismos aerobios, como es el caso de: los ensilados (Woolford, 1972), la fermentación de verduras, como la col agria y los pepinillos (Fleming, 1982), la de algunos panes agrios (Oura y col., 1982; Gashe, 1985) y algunos atoles fermentados (Gatumbi y col., 1983).

De acuerdo con Daeschel y col. (1987), algunas especies de bacterias lácticas se encuentran frecuentemente en la mayoría de las plantas, que constituyen su hábitat natural. Dentro de éstas se encuentran los géneros *Lactobacillus* (*L. arabinosus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Lactococcus* (*L. lactis*) y *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*).

Las bacterias del género *Leuconostoc* predominan en las plantas (Daeschel y col., 1987) y es común encontrarlas en alimentos fermentados de origen vegetal. *Leuconostoc mesenteroides*, que no crece en la leche, se encuentra en los productos no lácteos, donde comúnmente actúa como iniciador de las fermentaciones. Se encuentra en los tubérculos de yuca, junto con otras bacterias del género *Lactobacillus* (*L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. coprophilus*, *L. plantarum*), de tal manera que en las fermentaciones de yuca para la obtención de *gari*, *fufu* y *lafun*, aunque *Lactobacillus* se encuentra en mayor número en los tubérculos, *Leuconostoc* inicia la fermentación y posteriormente *Lactobacillus* predomina. Ambas bacterias son las principales productoras de ácido durante la fermentación y contribuyen a la producción del aroma típico de los productos (Okafor,



1977; Ngaba y Lee, 1979; Okafor y col., 1984; Onyekwere y col., 1989; Ofuya y Nnajiofor, 1989; Oyewole y Odunfa, 1990; Oyewole, 1990).

Es bien conocida la importancia de *Leuconostoc mesenteroides* en la iniciación de la fermentación de verduras, como la col agria y los pepinillos, así como su poca tolerancia a la acidez, que resulta en su reemplazo por cepas más resistentes, como *Lactobacillus plantarum*, que continúan produciendo ácidos (Fleming, 1982).

En el *kenkey* de Ghana (masa ácida de maíz producida por fermentación sólida de granos de maíz previamente remojados y molidos) *Leuconostoc* predomina al principio de la fermentación, aunque también se han aislado cepas de *Lactobacillus* (Christian y Nyako, 1983). Por otra parte, *Leuconostoc* es el responsable de la acción leudante y acidificante en panes ácidos como el *idli* de la India, el *puto* de Filipinas y el *enjera* de Etiopía. En algunos de éstos aparecen *Lactobacillus* y *Pediococcus* en etapas tardías de la fermentación produciendo una acidez excesiva que tiende a reducir el volumen de la masa (Pederson, 1983).

En otros alimentos predominan las bacterias del género *Lactobacillus*, como es el caso de algunas masas agrias para producir pan, sobre todo de centeno, que, aunque se encuentren *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, predominan los *Lactobacillus* heterofermentativos, como: *L. brevis* y *L. fermentum*. Se le atribuye al primero la producción de aroma, y a *L. plantarum*, que es homofermentativo, la elasticidad de la masa (Oura y col. 1982). En la producción de masas agrias de centeno o de trigo se establecen una levadura y una bacteria láctica del género *Lactobacillus*. Esta bacteria, para la que se ha sugerido el nombre de *Lactobacillus sanfrancisco*, tiene una preferencia por la maltosa como fuente de carbono, mientras que la levadura la tiene por la glucosa, por lo que forman una asociación estable (Wood, 1983). En el *ogi* de Nigeria, que se produce a partir de maíz, sorgo o mijo, incluye dos etapas de fermentación (una durante el remojo de los granos y otra después de su molienda húmeda, en forma de pasta), se encuentran varias especies de *Lactobacillus* desde las etapas de remojo. Esta bacteria

predomina y es la responsable de la acidificación (Onyekwere y col., 1989; Banigo y col., 1983). En la fermentación de una mezcla de maíz y agua para producir el *uji* de Kenya, se aislaron varias especies de *Lactobacillus* (*L. cellobiosus*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. plantarum*, constituyendo este último el 72% dentro del género) y de *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), pero no se aislaron *Lactococcus* ni *Leuconostoc* (Gatumbi y col., 1983). Durante 72 horas de fermentación natural del *mawe*, alimento de maíz de Benin y Togo, la mayor proporción de bacterias lácticas correspondió al género *Lactobacillus*, predominando dentro de éstas las heterofermentativas obligadas, y en particular *L. fermentum* (biotipo *cellobiosus*). Se aislaron además *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* y *Leuconostoc mesenteroides*, pero no se aisló *Lactobacillus plantarum* (Hounhouigan y col., 1993).

**Bacterias lácticas amilolíticas.** Las bacterias lácticas no tienen comúnmente la capacidad para hidrolizar el almidón. Las principales cepas amilolíticas reportadas son: *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cellobiosus* y *Lactobacillus plantarum* (Giraud y col., 1993a). Velázquez-Corona y col. (1982) demostraron la existencia de bacterias lácticas amilolíticas en muestras de coles agrias y de una masa de pozol.

Lindgren y Refai (1984) aislaron cepas de *Leuconostoc* amilolíticas de ensilados de pescado con cereales. La amilasa de una de las cepas tenía un pH óptimo de 5.8, estaba unida a la célula y producía maltosa y glucosa en proporciones de entre 5:1 a 6:1. Sen y Chakrabarty (1984) aislaron una cepa con actividad  $\alpha$ -amilasa de desperdicios de verduras y la identificaron como *Lactobacillus cellobiosus* D-36. Su crecimiento y producción de la enzima fueron máximos al pH de 7 y a 37°C, y estimulados por el  $\text{Ca}^{2+}$ . La enzima fue purificada y mostró estabilidad en un intervalo de pH de 6.3 a 7.9 y a temperaturas de hasta 50°C (Sen y Chakrabarty, 1986).

Nakamura (1981) aisló una cepa amilolítica de *Lactobacillus* de fermentaciones de desperdicios de maíz. La cepa fue identificada como *Lactobacillus amylovorus* y reconocida como una especie nueva. Pompeyo y col. (1993) reportaron diferencias en las propiedades de las amilasas producidas por *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylophilus*. *L. amylovorus* produjo la máxima actividad; su enzima fue estable a temperaturas más altas (50°C), comparada con *L. amylophilus* (40°C). La presencia de varios iones metálicos, como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Ba}^{2+}$  estimularon la actividad de *L. amylophilus*, pero inhibieron la de *L. amylovorus*. Las actividades de ambas fueron óptimas a valores de pH entre 5 y 6 y en presencia de  $\text{CaCO}_3$ , con maltosa para *L. amylovorus* y con sacarosa para *L. amylophilus*.

En un estudio sobre la digestión de almidón en pollos se aislaron 3 cepas de *Lactobacillus* del buche (Champ y col., 1983). Dos de las cepas produjeron maltosa, maltotriosa y cantidades pequeñas de glucosa, y la otra maltosa, maltotriosa y carbohidratos mayores que la maltopentaosa, a partir de amilopectina. La actividad amilolítica de las 3 cepas era muy baja cuando crecían en presencia de glucosa como única fuente de carbohidratos y mejoraba en presencia de maltosa.

De la fermentación de los tubérculos de yuca se aisló una cepa de *Lactobacillus plantarum* con actividad  $\alpha$ -amilasa extracelular. Su cinética de crecimiento fue similar en almidón que en glucosa; la enzima se sintetizaba cuando la concentración de glucosa era menor de 6.7 g/l, y su actividad fue tal que la hidrólisis de almidón no fue un factor limitante para el crecimiento, en un medio semidefinido (Giraud y col., 1991). Esta enzima fue caracterizada, encontrando que constaba de formas múltiples con actividad amilasa, con una principal  $\alpha$ -amilasa de 50 kDa, con un pH óptimo de 5.5, temperatura óptima de 65°C y un  $K_m$  de 2.38 g/l usando almidón soluble como sustrato (Giraud y col., 1993a).

Se estudió el efecto de la inoculación de la cepa amilolítica de *Lactobacillus plantarum* en la pulpa de yuca, para la producción de *gari* (Giraud y col., 1993b). Hasta las 24 horas

de fermentación no se observaron diferencias en la acidificación de la yuca inoculada con la cepa amilolítica y la inoculada con otra cepa de *Lactobacillus plantarum* no amilolítica; después de este tiempo se detuvo la producción de ácido en la segunda, mientras que en la primera continuó incrementándose, hasta alcanzar aproximadamente 50 g de ácido láctico por Kg de materia seca a las 72 horas de fermentación (comparada con aproximadamente 40 g/Kg de la cepa no amilolítica). La inoculación masiva de estas cepas inhibió el desarrollo de la microbiota natural, al producirse cantidades mínimas de ácidos diferentes al láctico; mientras que en la fermentación natural, no inoculada, la acidificación fue más lenta (a las 72 horas de fermentación la concentración de ácido láctico fue de aproximadamente 27 g/Kg y a las 96 horas menos de 35) y se produjeron en forma simultánea los ácidos láctico y acético, con trazas de propiónico, butírico y etanol.

En contraste, Mercier y col. (1992), en una fermentación de maíz machacado inoculado con *Lactobacillus amylophilus*, con control de pH por adición de hidróxido de amonio, obtuvieron 30 g/l de ácido láctico a las 72 horas de fermentación. Concluyeron que las posibles razones de la baja velocidad de biosíntesis de ácido láctico eran la viscosidad alta del medio, que limitaba la velocidad de la transferencia de masa, así como las limitaciones impuestas por el paso de hidrólisis del sustrato y la naturaleza incompleta del medio, ya que se usó maíz sin suplementar.

### **1.3.3 Enterobacterias**

Es común la presencia de enterobacterias al inicio de fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta. Dentro de las más estudiadas se encuentran las de verduras, donde participan en las etapas de iniciación y se consideran indeseables, por producir gas y ablandamiento por actividad pectinolítica. En materiales para ensilaje se encuentran en números mayores a los de las bacterias lácticas. Heron y col. (1993) consideran su presencia en pastos para ensilaje indeseable, por competir con las bacterias por nutrientes y por ser productoras de endotoxinas y de amoníaco. Estos autores aislaron especies

productoras de butanodiol, por lo que utilizaban azúcares fermentables sin contribuir a la producción de acidez.

Sin embargo, la mayor razón para considerar como indeseable al grupo de las enterobacterias en los alimentos fermentados es que dentro de él se incluyen microorganismos patógenos, causantes de enfermedades gastrointestinales, como *Salmonella*, *Shigella*, algunas cepas de *Escherichia coli* y de *Yersinia enterocolitica*.

Del *obiolor*, bebida no alcohólica de mijo de Nigeria, se aisló *Enterobacter*, presumiblemente por contaminación del suelo (Achi.,1990); del *ogi* se aisló *Enterobacter cloacae* (Onyekwere y col., 1989); del *fufu*, producido a partir de yuca, se aisló *Klebsiella* sp., cuya participación en la fermentación es importante, ya que se demostró que contribuía en el ablandamiento del tubérculo (Oyewole, 1990). En el *uji* se encontraron coliformes al principio de la fermentación (Gatumbi y col., 1983) y en el *kenkey* bacterias Gram negativas (Christian y Nyako, 1983). Del *enjera* se aislaron al inicio de la fermentación *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Citrobacter* sp. (Gashe, 1985). Este autor considera que dicho grupo de bacterias es necesario para iniciar la fermentación y promover el crecimiento de las bacterias lácticas, al disminuir el pH de la masa de 6.6 a 5.8. En la fermentación espontánea para la producción de masas agrias se encuentran enterobacterias pertenecientes al grupo coli-aerogenes, productores de gas y se considera que provienen de la microbiota natural de la harina (Oura y col., 1982; Wood, 1983).

Durante la fermentación del *tempeh* se ha considerado la importancia de *Klebsiella pneumoniae*, por ser productora de vitamina B12, de la que se encuentran deficiencias en dietas basadas en alimentos de origen vegetal (Steinkraus, 1983). Recientemente se reportó que la enterobacteria *Citrobacter freundii*, que también se aisló del pozol en este estudio, era la mejor productora de esta vitamina en el *tempeh*, y que la cantidad producida era tres veces mayor en presencia de *Rhizopus oligosporus*, el moho cuya

acción bioquímica imparte las características típicas de este alimento (Keuth y Bisping, 1993).

Salinas y Herrera (1974) aislaron del pozol *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*), capaz de fijar el nitrógeno atmosférico. A esta bacteria, junto con *Agrobacterium azotophilum*, se le ha atribuido una participación importante en el aumento en la concentración de proteína durante la fermentación de este alimento (Taboada y col., 1975; Leal y col., 1987)

#### 1.3.4 *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* son importantes en la fermentación de alimentos a base de granos con un contenido alto de proteína, como las leguminosas. Tal es el caso del *natto* japonés, en cuya fermentación es esencial *Bacillus natto*, el cual degrada la proteína de la soya (Hayashi y col, 1983). También es común que estas bacterias se encuentren asociadas con la fermentación de cereales, proveniente probablemente de los granos o como contaminación del aire.

Achi (1990) aisló cepas de *Bacillus* del *obiolor*, bebida de mijo consumida en Nigeria, y debido a que fueron cepas amilolíticas, se supuso que estimulaban el crecimiento de las bacterias lácticas al hidrolizar el almidón de los granos. Por otra parte, Nanson y Fields (1982) encontraron que un cultivo mixto de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas maltophilia* aumentaba en forma significativa el valor nutritivo relativo de un atole de maíz fermentado, con respecto al maíz no fermentado.

En la yuca se ha demostrado que *Bacillus* juega un papel importante en el ablandamiento de los tubérculos, probablemente por su actividad celulolítica, y por la producción del aroma típico durante la fermentación del *fufu* (Oyewole y Odunfa, 1990).

Estas bacterias podrían jugar un papel importante en la fermentación, pero dentro de este género existe una especie patógena, *Bacillus cereus*, capaz de producir toxinas que causan problemas gastrointestinales en humanos. Además de *Bacillus cereus*, otras especies de

este género (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*) han sido reportadas como patógenas (Kramer y Gilbert, 1989).

#### 1.4 CULTIVOS MIXTOS

Hesseltine (1992) señala que los procesos que involucran cultivos mixtos ofrecen una serie de ventajas sobre las fermentaciones convencionales de cultivos únicos. Dentro de éstas se encuentra la posibilidad de obtener mejores rendimientos de productos; velocidades de crecimiento mayores al proveer un microorganismo factores esenciales para el crecimiento de otros; la posibilidad de llevar a cabo transformaciones del sustrato en etapas múltiples; la posible garantía de formar asociaciones microbianas estables, de manera que aún cuando los alimentos sean preparados por individuos sin entrenamiento, el sistema regula la presencia al final de la fermentación de las mismas mezclas de microorganismos, aún después de años de resiembras.

Es común que los integrantes de un cultivo mixto se complementen entre sí y trabajen juntos para excluir microorganismos indeseables produciendo sustancias antimicrobianas o modificando el sustrato. De esta manera, los cultivos mixtos ofrecen protección contra contaminaciones, incluyendo infecciones por fagos, ya que poseen una base genética más amplia de resistencia a los mismos (si se infecta una cepa, las demás la reemplazan y la fermentación continúa).

El sustrato en los alimentos fermentados generalmente es una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, grasas y otros compuestos, y los cultivos mixtos, al reunir un amplio espectro de actividades enzimáticas, pueden atacar una mayor variedad de sustratos, de la misma manera como podrían destruir compuestos indeseables tóxicos o nocivos para el consumidor, humano o animal.

Estos cultivos presentan también desventajas: su estudio científico es difícil, así como la detección de contaminantes, la producción de cada uno de sus componentes por separado,

y el control del balance óptimo entre sus integrantes, si se pretende producirlos mediante la adición intencionada de inóculos, etc.

Es común que las fermentaciones naturales inicien con una microbiota muy variada, y los factores que determinan si algún grupo microbiano predomina pueden incluir la carga microbiana inicial, el tipo de nutrientes disponibles, las velocidades de crecimiento de ciertas especies, así como las condiciones físicas y químicas de la fermentación (Daeschel y col., 1987). Así, Viniegra-González y Gómez (1984) observan que la mayoría de las fermentaciones espontáneas de materiales comestibles son alcohólicas o lácticas y que el tipo de proceso depende de la naturaleza de la materia prima: la mayoría de los sustratos de las fermentaciones alcohólicas contienen concentraciones de azúcares relativamente altas y niveles bajos de proteína, lo cual parece coincidir con valores de la relación carbono/nitrógeno mayores de 30, mientras que en las lácticas esta relación es menor de 30.

Muñoz-González y Viniegra-González (1981) demostraron que la sucesión entre *Lactobacillus casei* y *Azotobacter chroococcum* era capaz de aumentar la eficiencia de fijación de nitrógeno con respecto al cultivo de *Azotobacter chroococcum* aislado. Estas observaciones sugieren la posible existencia de sinergismos entre las bacterias lácticas y las fijadoras de nitrógeno.

#### **1.4.1 Eliminación de microorganismos contaminantes en fermentaciones lácticas**

Una de las características de las fermentaciones con cultivos mixtos es la eliminación de microorganismos contaminantes y esto es especialmente notorio en el caso de las fermentaciones lácticas.

En la fermentación del *gari* se obtuvieron cuentas de *Leuconostoc* de  $10^8$  ufc/g en un día. Éstas se incrementaron a  $10^9$  en 4 días y se mantuvieron hasta el sexto día de fermentación. El otro grupo predominante de bacterias al inicio de este proceso fue



*Alcaligenes*, el cual fue eliminado al segundo día, cuando se había alcanzado un valor de pH de 4.5 (Onyekwere y col., 1989).

En fermentaciones donde las bacterias lácticas se desarrollan más lentamente, se reporta su predominio, con la desaparición de otro tipo de bacterias. Ofuya y Nnajofofor (1989) reportan una cuenta de bacterias, incluyendo *Lactobacillus* y *Alcaligenes*, de  $2 \times 10^4$  ufc/g al inicio de la fermentación natural de pulpa de yuca rallada. A las 24 horas de fermentación la cuenta bacteriana había incrementado a  $6 \times 10^5$  e incluía *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*. A partir de las 48 horas las únicas bacterias encontradas fueron *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, en un número de  $6.9 \times 10^6$  ufc/g. Además de las bacterias, se encontraban mohos y levaduras. En la fermentación de los tubérculos de yuca, durante su remojo para la obtención de *fufu* (Okafor y col., 1984), las cuentas iniciales de bacterias lácticas en el agua de remojo fueron más bajas: aproximadamente  $10^2$  ufc/ml de *Leuconostoc* y 32 ufc/ml de *Lactobacillus*. Ambos alcanzaron cuentas máximas de aproximadamente  $10^8$  ufc/ml hasta los 3 y 4 días de fermentación respectivamente. También se encontraron bacterias de los géneros *Bacillus* y *Klebsiella* al principio de la fermentación en números similares a los de las bacterias lácticas. Éstas crecieron hasta el segundo día, alcanzando números similares a los de las bacterias lácticas, pero a partir de este tiempo sus cuentas disminuyeron hasta desaparecer por completo después del tercer día.

Durante la fermentación sólida del maíz para la obtención del *kenkey*, Christian y Nyako (1983) reportan que las bacterias Gram negativas, catalasa positivas que se encuentran al inicio no se desarrollan apreciablemente y sus números disminuyen, de manera que al segundo día de fermentación ya no se detectan. La presencia de cocos Gram positivos, catalasa negativos (presumiblemente *Leuconostoc*) es evidente a partir de las 9 horas; al multiplicarse rápidamente, alcanzan un máximo entre las 24 y las 36 horas de fermentación y posteriormente las cuentas decrecen hasta el cuarto día de fermentación (Christian y Nyako, 1983). Halm y col. (1993), en un estudio sobre la sucesión de

micropoblaciones de este mismo alimento, informan que existe una selección hacia el dominio de las bacterias lácticas.

Tal vez el efecto más drástico de eliminación de contaminantes en la fermentación de alimentos a base de cereales, o de granos con un contenido alto de almidón, se observa en la producción de masas para la obtención de panes agrios. Al inicio de la fermentación se encuentra una microbiota muy variada, proveniente de los granos a partir de los cuales se prepara; sin embargo, los contaminantes aerobios, cuyas cuentas se pueden reducir mediante un lavado cuidadoso de los ingredientes, desaparecen rápidamente. Cuentas iniciales de aproximadamente  $10^4$  ufc/g de pasta desaparecen a las 4 horas de fermentación, cuando el valor de pH es de 6.2 en el *idli*. Por su parte, cuentas iniciales de bacterias aerobias de aproximadamente  $10^6$  ufc/g de arroz desaparecen del *puto* a las 6 horas de fermentación. De esta manera, en los panes como el *idli* y el *puto*, al momento de cocer la pasta se encuentran únicamente *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus faecalis* en números significativos; con una pequeña población de levaduras que contribuye en la acción leudante (Ramakrishnan y col., 1983; Sánchez y col., 1983). Gashe (1985) también ha observado un predominio de bacterias lácticas después de 30 horas de fermentación durante la fermentación de la masa para producir el pan ácido *tef*, pero considera que el crecimiento de las enterobacterias durante las primeras 18 horas de fermentación promueve el crecimiento de las bacterias lácticas al disminuir el pH. En la fermentación de masas agrias para producir los panes ácidos horneados del tipo del pan ácido de San Francisco, desaparece la flora acompañante para quedar únicamente bacterias lácticas y levaduras (Wood, 1983).

#### **1.4.2 Seguridad microbiológica de alimentos fermentados**

Las infecciones intestinales bacterianas y la diarrea infantil son endémicas en muchos países en vías de desarrollo, incluyendo México (Cravioto y col., 1988; Barrell y Rowland, 1979; Casalino y col., 1988). Los alimentos fermentados ácidos, como el pozol

y otros similares, como el *kenkey* y el *koko* de Ghana (Muller, 1970; Andah y Muller, 1973), y otros atoles y cervezas que se consumen en mayor escala (Muller, 1970; Haggblade y Holzapfel, 1989; Holzapfel, 1989) pueden jugar un papel importante para contrarrestar estas infecciones, si es que la fermentación ácida reduce la población de enteropatógenos que están presentes en el alimento.

El bajo valor de pH y la presencia de ácidos producidos durante la fermentación provocan que estos alimentos sean menos susceptibles a contaminaciones por bacterias patógenas que otros alimentos similares no fermentados (Mensah y col., 1988; Girma y col., 1989; Nout y col., 1989a; Mensah y col., 1990). En condiciones de higiene deficiente, estos productos son por lo tanto sustitutos de alimentos de destete más seguros que los basados en la leche de animales domésticos.

Para considerar tales aplicaciones, sin embargo, es esencial evitar en lo posible la contaminación de estos alimentos con las bacterias dañinas. Los métodos de preparación casera tradicional resultan en productos con niveles altos de bacterias de origen fecal y otras (Caparelli y Mata, 1975; Mensah y col., 1990), que una fermentación ácida puede no eliminar totalmente (Mensah y col., 1988, 1990).

Una de las características más importantes de los alimentos fermentados es que durante su producción se inhiben los microorganismos indeseables, como los patógenos. Esto puede deberse ya sea a la competencia por los nutrientes, que son consumidos preferentemente por los microorganismos que llevan a cabo la fermentación, al crecer en forma masiva, o a la producción de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas u otras sustancias inhibitoras. Así, durante la elaboración de quesos, las enterobacterias de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Escherichia*, presentes en la leche por malas prácticas higiénicas, después de incrementar sus números ligeramente durante la formación de la cuajada, desaparecen completamente durante la maduración del queso, cuando se alcanzan valores mínimos de pH de 4.3 a 4.6 (Tornadijo y col., 1993).

Nout (1992) estableció que con una combinación de condiciones, como valores bajos de pH en el alimento, menores de 4.5 o preferentemente menores de 4.0, y concentraciones de 1 a 1.5% de ácidos láctico y acético, es posible inhibir el crecimiento de las familias Bacillaceae, Micrococcaceae y Enterobacteriaceae en alimentos fermentados. Lorri y Svanberg (1992) encontraron que varias cepas de bacterias patógenas que causan comúnmente diarreas en países en desarrollo, como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*, se inhibían fuertemente al ser inoculadas en atoles de cereales fermentados de Tanzania. Además, en un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de diarreas en dos tribus diferentes de la misma región, se observaron más episodios de diarrea en la que consumía el atole no fermentado que en la que lo consumía fermentado. Simango y Rukure (1992) estudiaron la prevalencia de bacterias patógenas al inocularlas en *mahewu*, una papilla agria de maíz. Algunas, como *Aeromonas*, *Campylobacter* y *Salmonella*, se inhibían rápidamente, al no ser detectadas a los 10 minutos, 20 minutos y 4 horas respectivamente, después de su inoculación; *Shigella* y *Escherichia coli* mostraron mayor resistencia, pero no se detectaron después de 24 horas, mientras que ninguna fue inhibida al ser inoculada en la papilla no fermentada. Cuando se inocularon simultáneamente un cultivo láctico para la producción de *uji* y *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatógena y *Shigella dysenteriae* en suspensiones de maíz, se observó que durante las primeras 5 horas de fermentación a 25°C los patógenos crecieron ligeramente o sus números se mantuvieron constantes y después de ese tiempo se redujeron drásticamente desde aproximadamente  $10^8$  hasta  $10^3 - 10^5$  ufc/g en 30 horas de fermentación. El pH había disminuído de 5 a 3.5 en las primeras 5 horas y a 3 en 20 horas (Mbugua y Njenga, 1992). Por otra parte, Mensah y col. (1990), en un estudio en el que examinaron bacterias Gram negativas en muestras de alimentos de destete de maíz fermentados y no fermentados, preparados por madres de un pueblo de Ghana, encontraron que los niveles de estas

bacterias eran significativamente mayores en las papillas no fermentadas que en las fermentadas.

Las bacterias lácticas ejercen actividad antimicrobiana mediante la producción de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, de bacteriocinas, de diacetilo y de peróxido de hidrógeno (Daesche, 1989). Se ha enfatizado en la importancia de los ácidos orgánicos en la inhibición de enterobacterias en alimentos fermentados. Los ácidos orgánicos actúan como inhibidores de microorganismos dependiendo de su concentración, de su capacidad para entrar a la célula y de la capacidad de las células para metabolizarlos (Cherrington y col., 1991).

Nout (1992) considera que para lograr las condiciones propicias de acidificación se debe contar con un proceso de fermentación adecuado, de los tipos de ingredientes, de la capacidad amortiguadora del sustrato, de su contenido de materia seca, y del tiempo y de la temperatura de fermentación. Yusof y col. (1993) encontraron que un alimento de arroz prefermentado con una cepa de *Lactococcus lactis* presentaba actividad bactericida hacia bacterias patógenas. A pesar de que la bacteria producía concentraciones grandes de nisina, toda la acción antimicrobiana se atribuyó a la producción de acidez únicamente. Además, se detectó una inhibición potencialmente útil solamente cuando la bacteria láctica presentaba una superioridad numérica grande ( $>10^5:1$ ) con respecto al patógeno. Sin embargo, Lorri y Svanberg (1992) reportaron una mayor inhibición hacia bacterias patógenas en atoles fermentados, o sea durante la acción de células viables, que cuando éstos se acidificaron artificialmente, sugiriendo la acción de otros compuestos antimicrobianos además de los ácidos orgánicos.

Mensah y col. (1991) reportaron que durante el remojo de los granos de maíz disminuye su valor de pH, pero no existe un efecto antimicrobiano contra *Shigella* ni contra *Escherichia coli* enteropatógena, pero algunas cepas se inhibieron cuando el proceso de fermentación se había establecido. Concluyeron que este efecto antimicrobiano, que disminuía al cocer el alimento fermentado, no se debía al pH *per se* y que la disminución

del efecto antimicrobiano podía deberse a la pérdida de ácidos volátiles, como el acético, o de sustancias antimicrobianas termolábiles, como antibióticos o bacteriocinas.

McDonald y col. (1991) estudiaron el efecto de la adición de ácido acético en la reducción de enterobacterias presentes naturalmente durante la fermentación de pepinillos en salmuera. Encontraron que cuando no se acidificó la salmuera, mientras los números de enterobacterias permanecían constantes en ella, se incrementaban en el centro de los pepinillos y sólo después de 3 días se redujeron. Cuando se acidificó la salmuera, mientras el pH de ésta era de 3.1 al principio de la fermentación, el de los pepinillos era de 5.17; a los 3 días de fermentación el de la salmuera era de 3.62 y el de los pepinillos de 3.77. En ese tiempo, los números de enterobacterias en la salmuera se habían reducido drásticamente, mientras que en los pepinillos habían disminuido más lentamente; y al quinto día de fermentación, cuando los valores de pH en ambos eran similares (3.42, 3.41), no se detectaron enterobacterias. Los autores atribuyeron estos cambios a la modificación de los dos ambientes debido a la difusión de nutrientes del pepinillo (con condiciones iniciales favorables para el crecimiento microbiano) a la salmuera (con condiciones iniciales difíciles para el crecimiento microbiano) y, en el caso de la adición de ácido, a la difusión, en sentido contrario, de una sustancia antimicrobiana.

Östling y Lindgren (1993) estudiaron el efecto inhibitorio de los ácidos láctico, acético y fórmico en enterobacterias, corroborando que este efecto se debe principalmente a la forma no disociada de los ácidos, siendo el ácido fórmico el de mayor poder antimicrobiano. Confirmaron que este grupo microbiano no es particularmente resistente a la acción de los ácidos orgánicos, ya que se inhibió con niveles 10 veces menores de los ácidos estudiados que los mohos, las levaduras o las bacterias lácticas. Concluyeron que los niveles de ácidos no disociados presentes en los ensilados deben ser suficientes para evitar totalmente el crecimiento de las enterobacterias y que éstas pueden desarrollarse en los mismos cuando la producción de ácidos es limitada en las primeras etapas de la fermentación, o por degradación de los ácidos producidos (cuando existe deterioro

aeróbico) o por la heterogeneidad en la distribución de los ácidos en el material en fermentación, aún cuando la cantidad total de ácido producido sea alta.

Mediante estas observaciones se ha llegado a concluir que los alimentos fermentados, al suprimir el crecimiento de bacterias patógenas, son seguros desde el punto de vista microbiológico. Al no ser fuente de infecciones, podrían ser usados como alimentos de destete en regiones donde imperen condiciones higiénicas desfavorables y de esta manera reducir las enfermedades diarreicas en niños, que contribuyen fuertemente en las altas tasas de mortalidad y morbilidad infantil en países en desarrollo.

#### **1.4.3 Desarrollo de cultivos iniciadores para alimentos fermentados tradicionales**

Aunque en las fermentaciones naturales en las que intervienen cultivos mixtos tienden a predominar los microorganismos deseables y a inhibirse los de descomposición y los patógenos, la calidad de los productos obtenidos no siempre es la misma. La inoculación masiva con cepas seleccionadas permite en estos casos estandarizar la calidad de los alimentos al orientar la fermentación hacia la obtención de las características deseadas.

Ofuya y Nnajofo (1989) desarrollaron un cultivo iniciador para la producción de *gari*, el cual propagaron y mantuvieron en gránulos de coco en suspensión. Con éste obtuvieron un producto de calidad aceptable y similar al del obtenido por fermentación natural. Okafor y col. (1984) determinaron cuáles eran los microorganismos responsables del ablandamiento de los tubérculos de yuca durante su fermentación para la producción de *foo-foo*, mediante estudios en los que usaron cultivos puros y mixtos de cepas aisladas de la fermentación natural. Con una combinación de *Leuconostoc* y *Lactobacillus spp.* se producía el mayor descenso de pH; las cepas de *Bacillus* y de *Corynebacterium spp.* eran las responsables del ablandamiento de los tubérculos, y una mezcla de *Bacillus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* producían el aroma característico del producto.

Durante la industrialización del *mageu*, bebida ácida de maíz del sur de África (Holzapfel, 1989), se concluyó que la acidificación espontánea no era confiable debido a su lentitud, a

que procedía de manera irregular y en ocasiones permitía el desarrollo de microorganismos que causaban fermentaciones indeseables que podían provocar la descomposición del producto. Se encontró que el microorganismo esencial o típico de la fermentación era *Lactobacillus delbrueckii*, y en la producción comercial de esta bebida se usa como iniciador un cultivo heterogéneo de *Lactobacillus* termófilo.

Las fermentaciones tradicionales del maíz han sido ampliamente estudiadas en África (Achi, 1990; Akinrele, 1970; Andah y Muller, 1973; Banigo y col., 1983; Barrel y Rowland, 1979; Christian y Nyako, 1983; Gashe, 1985; Gatumbi y col., 1983; Giraud y col., 1993b; Haggblade y Holzapfel, 1989; Halm y col., 1993; Hounhouigan y col., 1993; Lorri y Svandberg, 1992; Mbugua y Njenga, 1992; Mensah y col., 1988; Muller, 1970; Ngaba y Lee, 1979; Nout y col., 1989a; Ofuya y Nnaji-for, 1989; Ogunsua y col., 1983; Okafor, 1977; Onyekwere y col., 1989; Oyewole y Odunfa, 1990) encontrándose que producen efectos benéficos, tales como: mejorar la calidad sanitaria del alimento, aumentar la concentración de vitaminas y aminoácidos esenciales y mejorar su textura, aroma y digestibilidad y se ha llegado en muchos casos a la industrialización del producto. Este tipo de alimentos ha sido estudiado en menor escala en México (Ulloa y col., 1987; Lappe y Ulloa, 1989; Escamilla-Hurtado y Mozqueda-González, 1992; Escamilla-Hurtado y col., 1993a; Escamilla-Hurtado y col., 1993b; Leal y col., 1987; Álvarez y Leal, 1993; Loaeza y Wachter, 1993).

A pesar de que el pozol ha sido estudiado desde hace tiempo (Cravioto y col., 1955; Cruz y Ulloa, 1973; Ulloa y Herrera, 1976-1982; Ulloa y col., 1983; Silva-Villarreal, 1984; Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado, 1988; Ramírez, 1987; Nuraida, 1988), se desconocen aspectos importantes de su bacteriología, no se ha determinado de qué manera influye en la calidad del producto el uso *sui generis* de la cal para elaborar el nixtamal, ni el posible efecto de las variantes de su proceso en las zonas rurales. Por lo tanto, en esta tesis se proponen los objetivos que se desglosan en el siguiente capítulo.



## **Capítulo 2**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Profundizar en el conocimiento sobre la microbiología del pozol, fundamentalmente en lo relacionado a su bacteriología y a la influencia que tienen las variantes técnicas del proceso en relación con la calidad microbiológica del producto.

#### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Conocer con detalle el método de elaboración de pozol y determinar la variabilidad en el mismo, en la zona Altos de Chiapas.
2. Caracterizar los microorganismos (en especial las bacterias) relacionados con la fermentación del pozol, presentes en muestras recolectadas en regiones productoras y a partir de muestras en las distintas etapas de las variantes del proceso.
3. Identificar las fuentes de inóculo natural en el proceso de elaboración de la masa de nixtamal para la producción de pozol para plantear posibles mejoras sanitarias del proceso.
4. Estudiar el desarrollo de los diferentes grupos microbianos durante la fermentación de la masa y sus posibles implicaciones sobre la calidad sanitaria del producto.

**5. Disponer de un modelo experimental de la fermentación del pozol que permita simular en el laboratorio la dinámica del proceso, así como la participación de microorganismos aislados en la fermentación y el efecto del uso *sui generis* de la cal en este alimento.**

## Capítulo 3

# MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### 3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

#### 3.1.1 Cuenta viable de bacterias lácticas

Se depositaron por duplicado 1 ml de las diluciones apropiadas de las muestras en cajas Petri, se les agregó Agar MRS (Oxoid CM361) y, una vez solidificadas, se cubrieron con una capa del mismo medio estéril. Se incubaron aeróbicamente a 28°C durante 4 días. Se seleccionaron algunas colonias para realizar la tinción de Gram (la cual debe ser positiva) y la prueba de catalasa (que debe ser negativa) para confirmar que fueran bacterias lácticas.

Para las muestras de masas de Tapachula se siguió el mismo procedimiento, pero se inocularon 0.1 ml de las diluciones sobre placas del medio preparado y se incubaron a temperatura ambiente (28-31°C).

#### 3.1.2 Cuenta viable de bacterias mesófilas no lácticas

Se prepararon placas de Agar para Cuenta en Placa (ACP, Merck 5463); se depositaron sobre su superficie 0.1 ml de las diluciones apropiadas, se extendieron con varilla de vidrio flameada y enfriada y se incubaron a 28°C durante 2 días. La temperatura de incubación de las placas inoculadas en Tapachula fue la del ambiente (28-31°C).

El medio de ACP permite el crecimiento de una gran diversidad de bacterias. No se le añaden carbohidratos (además de los que contienen los ingredientes), por lo que los microorganismos fermentadores obligados, como las bacterias lácticas, crecen muy poco y producen colonias muy pequeñas. Debido a esto, si se excluye a este grupo de bacterias, la cuenta en este medio se consideró como bacterias mesófilas no lácticas. Se

realizaron cuentas de las colonias mayores de 1 mm de diámetro, y para confirmar que no fueran bacterias lácticas se realizó la prueba de la catalasa (la cual debía ser positiva) a una muestra representativa de ellas.

### **3.1.3 Cuenta viable de enterobacterias**

Se enumeraron inoculando por duplicado con el método de vertido, usando el medio Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (ABRVG)(Oxoid CM485). Una vez solidificado el medio, se cubrió con una capa del mismo medio estéril y se incubaron a 28°C durante 1 o 2 días. Se contaron las colonias rojas rodeadas de un precipitado rojo. La temperatura de incubación de las placas inoculadas en Tapachula fue la del ambiente (28-31°C).

### **3.1.4 Cuenta viable de mohos y levaduras**

Experimentos en San Cristóbal de las Casas: Se enumeraron los mohos y las levaduras sobre la superficie de placas de Agar Papa Dextrosa acidificado (APD, Merck 10130; el pH se ajustó a 3.5 añadiendo 1.4 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10% (p/v) a 100 ml del medio esterilizado y enfriado a 50°C). Se inocularon las placas con 0.1 ml de las diluciones apropiadas y se incubaron a 28°C durante 4 días.

Experimentos en Tapachula: Se inocularon 0.1 ml de las diluciones apropiadas en placas de Agar Extracto de Malta acidificado (AEM, Oxoid CM59; el pH se ajustó a 3.5 añadiendo HCl 0.1N al medio esterilizado y enfriado a 50°C). Se incubaron a temperatura ambiente (28-31°C) durante 4 días.

### **3.1.5 Cuenta microscópica por el método de Breed**

Se determinó en cada caso una cuenta microscópica para confirmar la recuperación en las placas de cuentas con el mismo orden de magnitud. Con esto se tenía la certeza de que el medio de cultivo utilizado era el apropiado para recuperar la mayoría de los microorganismos presentes en la masa.

Se marcó un área de 1 cm<sup>2</sup> con un lápiz graso sobre la superficie de un portaobjetos y se extendió sobre ésta una asada (asa de 4 mm) de una dilución de la muestra. Se dejó secar la preparación, se fijó con calor, se realizó una tinción de Gram y se contaron las bacterias presentes en varios campos, utilizando un microscopio portátil McArthur (Prior Scientific Instruments, Ltd. Bishop's Stortford, Herts., Reino Unido). Con el microscopio calibrado se calculó el área por campo y se calculó la cuenta por cm<sup>2</sup>. Se calculó la cuenta por ml tomando en cuenta que con el asa de 4 mm de diámetro se habían depositado 0.01 ml de la dilución de la muestra.

## **3.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS**

### **3.2.1 Aislamiento y purificación**

Se seleccionaron colonias representativas de cada grupo bacteriano, se tomaron con un asa recta y se inocularon por estría en placas del mismo medio en que se había realizado la cuenta viable. Se incubaron en las mismas condiciones en las que se habían realizado las cuentas y se examinó la pureza, tomando en cuenta la uniformidad en su apariencia. Si el cultivo era puro, se transferían varias colonias aisladas al medio líquido apropiado: Caldo APT (Difco 0645-01-8) para las bacterias lácticas; caldo nutritivo (Oxoid CM1) para las enterobacterias y las bacterias mesófilas no lácticas. Si no era puro se transfería una colonia al medio líquido, para después comprobar la pureza al inocular por estría en medio sólido.

### **3.2.2 Conservación de las cepas**

Las bacterias lácticas se mantuvieron en agar APT semisólido con carbonato de calcio. Se preparó Caldo APT siguiendo las instrucciones del proveedor, pero incluyendo 0.3% de Bacto-agar (Difco 0141-01). El medio se disolvió con calor y se distribuyeron aproximadamente 3 ml en viales de 7 ml con tapón de rosca. Se agregó a cada vial una punta de espátula (aproximadamente 0.5 g) de CaCO<sub>3</sub> y se esterizaron a 121°C durante

15 minutos. Se inoculó cada tubo con una asada de la bacteria láctica correspondiente y se incubó a 30°C durante 48 horas. Los aislamientos se conservaron a 5°C, resemebrándose cada 2 o 3 meses.

Las enterobacterias y las bacterias mesófilas no lácticas se resemebraron en tubos con ACP (Merck 5463 u Oxoid CM325) inclinado. Los tubos inoculados se incubaron a 30°C durante 18 horas y se conservaron a 5°C, resemebrándose cada 3 o 4 meses.

Todas las bacterias se conservaron también a -70°C en viales con perlas perforadas (Protect Bacterial Preservers, Technical Services Consultants Ltd., Inglaterra).

### **3.2.3 Caracterización de bacterias lácticas**

Tinción de Gram y prueba de catalasa. Se realizaron de acuerdo con los métodos descritos por Harrigan y McCance (1976).

Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa. Se utilizó esta prueba para distinguir las bacterias homofermentativas de las heterofermentativas. Se preparó el medio Gibson semisólido de jugo de tomate de acuerdo con Harrigan y McCance (1976) (g/l): extracto de levadura, 2.5; D-glucosa, 50; jugo de tomate pH 6.5, 100 ml; leche descremada reconstituida, 100 ml; agar nutritivo, 200 ml y se distribuyó en tubos de ensaye. Justo antes de usarse, el medio se fundió calentándolo en baño de agua hirviendo y se enfrió. Se inoculó con 0.5 ml de un cultivo crecido en Caldo APT durante 48 horas y cada tubo se selló con 2 ml de Bacto-agar esterilizado y fundido, formando una capa de 2 a 3 cm sobre el medio, para crear condiciones de anaerobiosis. Se incubaron a 30°C durante 5 días. La ruptura del sello de agar por producción de gas indicó la presencia de metabolismo heterofermentativo.

Producción de dextrana a partir de sacarosa. Se prepararon placas del medio de Garvie (Garvie, 1960), que contiene (g/l): triptona (Merck 7213), 10; extracto de levadura (Difco 0127-01), 5.0; sacarosa, 100; solución de azida de sodio al 1%, 5 ml y agar bacteriológico (Bioxon 150-1), 15; pH 6.4-6.6. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se inocularon por estría y se incubaron de 1 a 7 días a 30°C. El crecimiento de colonias mucosas fue indicativo de la producción de dextrana.

Hidrólisis de almidón. Se prepararon placas del medio APT-almidón, que contiene (g/l): extracto de levadura (Difco 0127-01), 7.5; triptona (Merck 7213), 12.5; citrato de sodio, 5.0; tiamina hidrociorada, 0.0001; NaCl, 5.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.0; MnCl<sub>2</sub>, 0.14; MgSO<sub>4</sub>, 0.8; FeSO<sub>4</sub>, 0.04; tween 80, 0.2; glucosa, 0.5; almidón soluble (Mallinckrodt 8188), 10 y agar bacteriológico (Bioxon 150-1), 15. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Se sembraron por estría dos placas de cada cepa, se incubó una en condiciones aeróbicas y otra en condiciones anaeróbicas, utilizando para esto jarras de anaerobiosis con mezcla generadora de atmósfera anaerobia (BBL GasPak Anaerobic Systems 70304), a 30°C durante 5 días. Después de este tiempo se agregó lugol de Gram, preparado de acuerdo con Harrigan y McCance (1976). La desaparición del color azul oscuro alrededor de las colonias fue indicativo de actividad amilolítica.

### **3.2.4 Caracterización de enterobacterias**

Tinción de Gram y prueba de oxidasa. Se realizaron de acuerdo con los métodos descritos por Harrigan y McCance (1976).

Identificación utilizando el sistema API 20E. El sistema API 20E (Bio-Mérieux 2010) es un kit de pruebas bioquímicas miniaturizadas para la identificación de enterobacterias y de otras bacterias Gram negativas. Este sistema puede identificar, mediante la realización de 23 pruebas bioquímicas, 108 géneros y 104 especies de estas bacterias. Cada galería

API consta de 20 microtubos que contienen los medios de cultivo deshidratados para las pruebas bioquímicas. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Después de la incubación se observan los cambios de color producidos en cada medio o los producidos al añadir reactivos. A cada prueba se le asigna un valor numérico, dependiendo de su resultado, y los valores se agrupan para obtener un número, con el que se obtiene la identificación usando la tabla provista para ello o un software.

Las cepas se sembraron en Agar McConkey (Oxoid CM 7) y se incubaron a 35°C durante 24 horas. Una colonia aislada se suspendió en 5 ml de solución salina al 0.8%, hasta igualar la turbidez del tubo 3 de la escala de McFarland (éste se preparó mezclando 0.3 ml de BaCl<sub>2</sub> al 1% y 9.7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%). Con esta suspensión se inocularon el tubo y la cúpula de las pruebas citrato, Voges Proskauer y gelatina, los tubos de las demás y las cúpulas de las pruebas arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ureasa y H<sub>2</sub>S. Finalmente se llenaron con aceite mineral estéril. Se incubaron a 35°C durante 18 horas. Se añadieron los reactivos correspondientes a las pruebas de triptofano desaminasa, indol y Voges Proskauer, se interpretaron los resultados de acuerdo con la Tabla 3.1 y se realizó la identificación utilizando la tabla correspondiente (API 20E Analytical Profile Index, Bio-Mérieux 2019)

### **3.2.5 Caracterización de bacterias mesófilas no lácticas.**

Tinción de Gram y prueba de catalasa. Se realizaron de acuerdo al método descrito por Harrigan y McCance (1976).



### **3.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS**

#### **3.3.1 Determinación de humedad.**

Se determinó el contenido de humedad de las masas por diferencia en peso al secar la muestra en estufa a 100°C hasta peso constante.

#### **3.3.2 Determinación de pH.**

Se mezclaron 2 g de masa con 18 ml de agua destilada durante un minuto, con agitador magnético a 2000 rpm. Después de dejar la muestra sedimentando durante 15 segundos se determinó el pH en la fase acuosa con un potenciómetro digital Beckman Mod. 3500.

En el caso de los experimentos del Capítulo 5, se mezclaron 2 g de masa con 2 ml de agua destilada y se determinó el pH con el mismo potenciómetro.

**Tabla 3.1.** Tabla de identificación, para la interpretación de resultados del sistema API 20E

Pruebas	Sustratos	Reacciones/enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
ONPG	o-nitrofenol-galactósido	$\beta$ -galactosidasa	incoloro	amarillo (1)
ADH	arginina	arginina dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	anaranjado
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
CIT	citrato sódico	utilización de citrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/verde (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	producción de H <sub>2</sub> S	incoloro/grisáceo	depósito negro
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo/anaranjado
TDA	triptofano	triptofano desaminasa	Lectura inmediata después de agregar reactivo TDA (5)	
			amarillo	marrón oscuro
IND	triptofano	producción de indol	Lectura 2 minutos después de agregar reactivo IND (5)	
			amarillo	anillo rojo
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	Lectura 10 minutos después de agregar los reactivos VP1 y VP2 (5)	
			incoloro	rosado/rojo
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MAN	manitol	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	inositol	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	fermentación/oxidación (4)	azul/azul verdoso	amarillo

- (1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.
- (2) Un color naranja después de 24 h de incubación debe considerarse negativo.
- (3) La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis).
- (4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula.
- (5) TDA, cloruro férrico; IND, reactivo de Kovac; VP1, hidróxido de potasio; VP2, 1-naftol.

## Capítulo 4

# CARACTERÍSTICAS Y MICROBIOLOGÍA DE POZOLES TRADICIONALES

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DEL POZOL

Aunque se ha estudiado la fermentación del pozol, todavía no se cuenta con la información básica sobre su producción y sobre aspectos importantes de su microbiología y de las transformaciones bioquímicas asociadas.

El pozol se prepara a nivel casero y en una diversidad de condiciones artesanales. Hesseltine y Wang (1986) enfatizan la importancia de conocer en detalle el proceso de elaboración de los alimentos fermentados. Para ello recomiendan que se busquen varias fuentes de información, asegurándose la comprensión de cada uno de los pasos del proceso y de las variaciones del mismo. Como se mencionó en el capítulo de Generalidades, ningún estudio previo se ha centrado en describir la heterogeneidad del pozol. Por esta razón, resulta necesario realizar, antes de los análisis microbiológicos, un estudio que permita establecer las variaciones básicas y distintivas entre los procesos de elaboración que siguen diferentes productores, y que estas variaciones se asocien con las características finales del producto. Por otra parte, se detectó la necesidad de conocer con detalle los aspectos específicos de las diferentes etapas de su elaboración, con el objeto de deducir cuáles son críticas en el éxito o fracaso del proceso y así contar con mejores elementos para el diseño de experimentos. Con estos elementos de decisión se realizaron dos estudios, uno sobre los tipos de pozol en diferentes zonas del estado de Chiapas y otro más detallado del proceso de elaboración en la zona Altos de Chiapas.

## **4.1.1 EVALUACIÓN SUBJETIVA DE POZOLES DE DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE CHIAPAS**

### **4.1.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

Con el fin de determinar si, en lo general, existen diferentes tipos de pozol asociados con diferentes zonas del estado de Chiapas, se adquirieron muestras de diversos mercados de San Cristóbal de las Casas, Chiapa de Corzo, Tuxtla Gutiérrez, Palenque y Comitán, así como de productores varios del mismo mercado. Las muestras se dejaron fermentar a temperatura ambiente durante un periodo aproximado de 7 días. En este tiempo se realizó un análisis básico del producto, que incluyó su descripción y algunas propiedades sensoriales como olor, color y consistencia.

Se determinó el pH del interior y superficie de las masas, de acuerdo con los procedimientos señalados en los métodos generales.

### **4.1.1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El pozol se ha definido como una "masa de maíz fermentada en forma de bolas de varias formas y tamaños, envueltas en hojas de plátano" (Ulloa y col., 1983). Los mismos autores establecen que durante la fermentación de la masa ocurren dos cambios esenciales, que son el desarrollo de un sabor ácido y un aroma característico que le imparten al pozol sus propiedades refrescantes. Por otra parte, Cravioto y col. (1955) encontraron que es posible observar mohos en su superficie y que los cambios organolépticos de la masa fermentada son la acidificación o agriado y un olor peculiar que recuerda al de ciertos quesos.

En general las características de los pozoles encontrados coincidieron con las definiciones anteriores (Tabla 4.1). Se encontró que existen diferentes tipos de pozol en todas las regiones, aunque no un tipo característico en cada región.

**TABLA 4.1** Características de muestras de pozoles de diferentes zonas del estado de Chiapas

<b>Núm. DE MUESTRA</b>	<b>TIPO Y PRESENTACIÓN</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>APARIENCIA *</b>	<b>pH interior</b>	<b>pH superficie</b>
1	Pozol blanco, bolas envueltas en hojas de plátano	San Cristóbal de las Casas, productor 1	Olor frutal, moho blanco en la superficie	3.9	4.2
2	Pozol blanco, bolas envueltas en hojas de plátano	San Cristóbal de las Casas, productor 2	Olor frutal, moho blanco en la superficie	3.7	4.5
3	Pozol blanco, masa a granel en cubeta	San Cristóbal de las Casas, productor 3	Fuerte olor a ácido	3.8	3.9
4	Pozol de cacao, masa a granel en cubeta	San Cristóbal de las Casas, productor 3	Olor rancio desagradable	3.8	3.8
5	Pozol blanco, bolas envueltas en hojas de plátano	San Cristóbal de las Casas, productor 4	Olor agradable a ésteres, moho blanco en la superficie	3.9	6.0
6	Pozol de maíz negro, en bolas	San Cristóbal de las Casas, productor 5	Olor ácido agradable, al acidificarse el color azul del maíz cambia a rosado	4.1	4.7
7	Pozol blanco, bolas envueltas en hojas de plátano	San Cristóbal de las Casas, productor 6	Olor agradable a ésteres, moho blanco en la superficie	4.0	3.9
8	Pozol blanco, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 1	Muy húmedo, olor ácido desagradable	3.6	
9	Pozol de cacao, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 1	Muy húmedo, olor ácido desagradable	3.8	
10	Pozol de cacao, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 2	Olor a chocolate	3.8	3.9
11	Pozol blanco, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 2	Fuerte olor a ácido (acético?)	3.8	3.8

Continuación Tabla 4.1

Núm. DE MUESTRA	TIPO Y PRESENTACIÓN	PROCEDENCIA	APARIENCIA *	pH interior	pH superficie
12	Pozol de cacao, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 3	Olor a chocolate	3.9	3.9
13	Pozol blanco, masa a granel en cubeta	Chiapa de Corzo, productor 3	Muy húmedo, olor ácido fuerte	3.7	3.8
14	Pozol blanco, masa a granel en cubeta	Tuxtla Gutiérrez, productor 1	Muy húmedo, olor ácido desagradable	3.8	
15	Pozol blanco, bolas envueltas en hojas de plátano	Palenque, productor 1	Olor agradable a ésteres, con moho blanco en la superficie	4.1	4.7
16	Pozol de cacao, masa a granel en cubeta	Comitán, productor 1	Húmedo, olor a chocolate y ácido	3.9	3.9

\* Se presentan los datos de las muestras fermentadas durante 7 días a partir de su recolección. Las muestras se fermentaron a temperatura ambiente en la forma como se recolectaron: envueltas en hojas de plátano o en bolsas de plástico.

Aunque la apariencia de las masas recién adquiridas en el mercado fue muy similar, se observaron variaciones en la presentación de las mismas: la tradicional, que es en forma de bolas y envueltas en hojas de plátano; en forma de bolas y empacando varias de ellas en una bolsa de plástico, o la masa a granel sin formar bolas. Se puede utilizar maíz blanco o negro para elaborar las masas, y en ocasiones se le añade cacao y la molienda no es muy fina, de tal manera que se observan partículas de granos de maíz. Sin embargo, en el producto fermentado final sí se observaron variaciones importantes. Mientras que en algunos casos se obtuvo un producto de olor ácido agradable y en ocasiones frutal, en otras el olor fue ácido penetrante y desagradable, o el olor a cacao predominó sobre los demás. En general las masas envueltas en hojas de plátano conservaron su forma, presentaron un crecimiento filamentoso blanco en su superficie y características sensoriales agradables. Algunas de las contenidas en bolsa de plástico presentaron características similares a las descritas anteriormente, pero en general las masas se humedecieron y presentaron olores desagradables. El sabor de la bebida preparada al suspender en agua las masas 10 y 11 (según Tabla 4.1) con aproximadamente 8 horas de fermentación fue de nixtamal, agradable y refrescante, pero no se percibió el sabor ácido; en tanto que la masa producida por el mismo productor, con 24 horas de fermentación fue ácido y agradable.

El pH de las masas recién adquiridas (con aproximadamente 8 horas de fermentación) presentaba valores bajos, indicando que la fermentación láctica ocurre rápidamente. Los de las masas con 7 días de fermentación variaron en el intervalo de 3.1 a 4.7, con un valor de 6.0 en la superficie de una de las muestras. El pH del interior de las masas siempre fue ligeramente menor (con una diferencia menor de una unidad de pH) que el del exterior. Esto puede deberse a que las condiciones menos aerobias del centro de la masa favorecen la fermentación láctica o a que los mohos, que pueden desarrollarse en la superficie debido a sus condiciones aeróbicas, consumen ácidos incrementando el pH.

### **4.1.1.3 CONCLUSIÓN**

1. Los pozoles estudiados cumplen con la descripción reportada en la literatura en cuanto a ser una masa de maíz acidificada; sin embargo existen variaciones notables en cuanto al aroma, apariencia, presentación y adición de ingredientes diferentes al maíz.

## **4.1.2 LA ELABORACIÓN DE POZOL EN LOS ALTOS DE CHIAPAS**

### **4.1.2.1 INTRODUCCIÓN**

Al detectarse la existencia de diferentes tipos de pozol en diferentes regiones del estado de Chiapas, y aun dentro de la misma región, se decidió realizar un estudio más profundo para determinar: cuál es el proceso detallado de elaboración de pozol, si existen variaciones en el mismo y cuáles son las características que distinguen a un producto como aceptable o no. Se seleccionó la región Altos para llevar a cabo el estudio.

#### **La región de estudio**

El pozol se produce en el sureste de México, y Chiapas es uno de los estados donde su consumo es generalizado. Este estado cuenta con 3.5 millones de habitantes, de los cuales se calcula que los indígenas representan el 22% de la población (López Moreno, comunicación personal). La entidad está integrada por 110 municipios que conforman nueve regiones geográfico-políticas (Figura 4.1).

Se seleccionó la zona Altos para realizar el estudio sobre la variabilidad en la producción del pozol debido a que, al ser un alimento de origen maya, en esta región habitan un elevado número de grupos étnicos, sobre todo de los tzeltal y tzotzil. El tzeltal es el grupo indígena más numeroso de Chiapas y el octavo en relación con los demás grupos indígenas del país. Los municipios tzeltales más importantes en cuanto a población son Tenejapa y Oxchuc. Los tzotziles, por su número, ocupan el décimo lugar entre los



grupos indígenas del país. Los municipios con mayor población tzotzil son Chamula y Zinacantán.

San Cristóbal de las Casas, cabecera y centro integrador de la zona Altos, depende completamente para su abastecimiento diario de los productos de las tierras altas indígenas. Allí se encuentra el mercado indígena más grande del país, el "Mercado Municipal José Castillo Tielmans". En él se reúnen, entre otros, los productores de pozol que elaboran este alimento con fines comerciales. Debido a las características anteriormente mencionadas, la zona Altos de Chiapas y en especial su centro, la ciudad de San Cristóbal de las Casas, constituyen un lugar apropiado para muestrear y llevar a cabo estudios relacionados con la producción del pozol.

### **Tipos de productores**

El pozol se produce tradicionalmente a nivel casero, de manera que hay productores familiares que lo elaboran para autoconsumo. Los productores comerciales lo elaboran generalmente en sus casas, pero a mayor escala, para venderlo en el mercado. Existen también productores ambulantes.

Es relevante la distinción entre productores indígenas y mestizos. Según Campos y col. (1982), los criterios con los que el indígena se identifica a sí mismo son: el hablar alguna lengua indígena, vivir en los parajes, en casas de barro con techo de zacate, vestir chamarro, no tener dinero y no hablar, o hablar muy poco, el idioma español. En tanto, el ladino (mestizo) se identifica por (sic) "hablar castilla, tener dinero, vestir ropa occidental y vivir en casa de concreto". Este criterio se confirmó para la región de estudio y se utilizó en este trabajo para clasificar a los productores.

#### **4.1.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Como primera etapa del estudio, se seleccionó una muestra representativa de productores que comercializaban en el mercado municipal; un productor que elabora pozol "especial" (bajo pedido); un productor ambulante; un productor familiar de cada uno de los municipios más grandes de las zonas tzeltal y tzotzil (Chamula, Oxchuc, Tenejapa y Zinacantán) y seis productores familiares de San Cristóbal. Se observó el proceso de elaboración de cada productor para llenar un cuestionario, que incluía las siguientes preguntas:

**Datos generales del productor:** Nombre, domicilio, edad, si es sindicalizado o no, ladino o indígena, si sabe leer o escribir, cuánto hace que vende pozol y si su venta representa un ingreso familiar único o complementario.

**Tipo de vivienda:** Tipo de pared, de pisos, de techo, existencia de luz eléctrica, agua potable, drenaje, chiquero, gallinero, basurero, sanitarios.

**Proceso de elaboración de pozol:**

**Tipo de pozol, tipo de maíz y razón por la cual se eligió ese tipo, dónde lo adquiere, cantidad que procesa.**

**Método de limpieza del maíz, cantidad de cal añadida y manera de adición.**

**Método de cocción, tipo de recipiente, lugar donde se efectúa, tiempo de cocción.**

**Técnica de remojo. Método de lavado.**

**Realiza segunda cocción? motivo, tiempo de cocción.**

**Tipo de molienda. Tipo de moldeado. Características de las bolas: peso, precio, aspecto, cantidad elaborada.**

**Tipo de empaque y razón por la que se usa.**

**Forma de distribución y venta.**

**Concepto de pozol descompuesto.**

**Manera de consumo.**

**Varios.**

### **4.1.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Consideraciones socioculturales**

La existencia de servicios públicos fue deficiente en el domicilio de los productores. Fue muy común la falta de energía eléctrica, agua potable, drenaje y servicios sanitarios adecuados, tanto entre los indígenas como entre los ladinos, así como las viviendas con paredes de adobe o tablas, pisos de tierra y techos de lámina. De hecho, según los datos del X Censo General de Población y Vivienda de 1980, en la zona Altos de Chiapas sólo el 51.6% de los habitantes cuenta con servicio de agua potable y sólo el 42.1% con servicio de electricidad. Estas carencias influyen de manera decisiva en los métodos de elaboración del pozol, fundamentalmente en relación a la higiene.

En general los productores de edad avanzada (aprox. 55-60 años) no sabían leer ni escribir, mientras que los jóvenes sí, en ambos casos, tanto ladinos como indígenas. En 7 de 12 casos la venta del pozol representaba el único ingreso para la familia y para los demás era un ingreso complementario. Aunque existieron productores que vendían pozol a partir de los últimos 2 o 3 años, en varios casos lo habían estado produciendo durante 15 o más de 20 años.

Es importante notar que todos los productores indígenas que comercializaban en el mercado de San Cristóbal son originarios del municipio de Oxchuc. Éste es un hecho interesante, ya que existen otros 3 municipios (Chamula, Zinacantán y Tenejapa), que por su cercanía y facilidad de transporte podrían suministrar pozol.

#### **La materia prima: el maíz**

Para la elaboración de pozol se utilizan 3 tipos de maíz: blanco, amarillo y negro. El maíz blanco y el amarillo presentan cada uno dos variedades: el pacha (o pachita) y el bolita. El negro y las variedades bolita pertenecen posiblemente a la raza *olotón*, mientras

que la raza probable del blanco pacha es *tuxpeño* y la del amarillo pacha es *olotillo* (Ortega Paczka, comunicación personal).

El maíz pacha se adquiere generalmente en las tiendas gubernamentales CONASUPO y de acuerdo con los habitantes de la región es un híbrido que se cultiva en Tierra Caliente (en las zonas situadas abajo de 1000 metros sobre el nivel del mar). Es un maíz de mala calidad, sucio, picado y considerado como poco rendidor en la elaboración de pozol; sin embargo muchos productores lo prefieren, ya que lo pueden adquirir cerca de sus casas.

El maíz bolita es un maíz criollo de temporal, cultivado en tierra fría, que se distribuye en el mercado local. Es de mejor calidad que el pacha y según los productores es más suave, tiene mayores rendimientos y con él se produce un pozol de mejor consistencia y calidad. Sin embargo, los indígenas tienen que comprarlo en el mercado de San Cristóbal y cargarlo durante trayectos largos para usarlo.

El maíz negro, que presenta una sola variedad, es un criollo de temporal originario de la zona Altos. Se obtiene de mazorcas que tienen granos con diferentes tonalidades (desde blanco hasta morado).

Los productores comerciales indígenas no elaboran pozol del maíz obtenido en sus milpas debido a que éste es de temporal y la cosecha debe ser suficiente para cubrir las necesidades familiares durante un año. Utilizar este maíz en la elaboración de pozol para vender podría mermar su reserva para otras formas de consumo.

En la elaboración de pozol se utiliza generalmente maíz maduro. Es posible elaborar pozol de maíz tierno, pero se requiere mayor cantidad de cal para eliminar el hollejo durante la cocción. Esto modifica el sabor y es desfavorable desde el punto de vista económico. Por otra parte, el pozol de maíz tierno se acidifica más rápido, resultando en modificaciones sensoriales.

## **Etapas de elaboración del pozol**

**Limpieza del maíz.** El maíz se limpia para eliminar material extraño y granos de maíz podrido, que darían mal aspecto al pozol. Para ello, comúnmente se agrega agua al maíz crudo, de manera que lo cubra por lo menos 10 o 15 cm. Se deja reposar unos minutos y se procede a retirar todo lo que flota, que es maíz picado o podrido y cascarillas.

Otro método consiste en vaciar el maíz de un canasto sostenido a cierta altura a otro ubicado a desnivel, de manera que, mientras el maíz cae se sopla con un sombrero o con un cartón para separar la cascarilla. Posteriormente es necesario separar manualmente los granos malos.

**Nixtamalización<sup>1</sup>.** La nixtamalización del maíz consiste en la cocción de los granos en agua con cal y su objetivo es lograr la separación del hollejo (o cascarilla) del grano. Los productores comerciales la llevan a cabo en cubetas de metal y los familiares en recipientes de peltre o de barro.

La cal, que se adquiere en el mercado local, se puede agregar directamente sobre el maíz seco al que después se le adiciona el agua, o sobre la mezcla de maíz con agua. Algunos productores mestizos, más integrados a la cultura citadina y que en esta región se les denomina ladinos, suspenden previamente la cal en agua, esperan a que sedimente y la agregan sin este residuo. Argumentan que no es conveniente su presencia en el producto. Por el contrario, los indígenas añaden directamente la suspensión de cal sin decantar.

La cantidad de cal necesaria, que los productores conocen por experiencia y miden por puños, es muy importante. Si es insuficiente, los indígenas califican al nixtamal resultante como "jush", término que traducen como "nixtamal cocido sin cal o con poca cal"; los ladinos también utilizan este término y lo traducen como "maíz duro para puercos". Si la cantidad es mayor a la necesaria, es necesario lavar muy bien el nixtamal

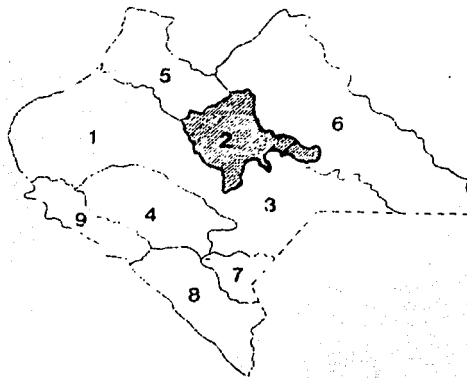
---

<sup>1</sup>del azteca *nextli*= cenizas, es decir, cocimiento del maíz con álcalis

para eliminar el exceso. Este lavado debe efectuarse antes de que transcurran 4 horas después del cocimiento, de lo contrario, el grano de maíz se impregna de cal, adquiere una tonalidad verde-azulosa y el sabor del pozol es picante. Una vez que esto sucede, ni el lavado más exhaustivo elimina el defecto. Durante la nixtamalización el maíz adquiere un color amarillo que se elimina con el lavado. Esto se observa sobre todo en el caso del maíz blanco. La cocción se lleva a cabo por lo general en hogueras que varían de acuerdo al nivel socio-económico del productor. Entre los indígenas esta operación se lleva a cabo en hogueras a ras del suelo o elevadas. La cubeta (u olla) se coloca colgada de una viga del techo directamente sobre la hoguera. Los productores ladinos que usan hoguera colocan la cubeta sobre un tripie sin colgar del techo. Es común también el uso de fogones y a veces el de estufas o estufones de gas. La cocción termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos. Este tiempo varía entre 60 y 120 minutos.

Lavado del nixtamal. El lavado del nixtamal se lleva a cabo con agua de pozo, de río o potable, con el fin de eliminar la cal y el hollejo. El maíz tratado se coloca en recipientes perforados (cubetas de plástico con horadaciones o canastas) (Figura 4.2), se lava y se frota con las manos hasta que el agua residual sea clara. Otra técnica consiste en agregar agua al nixtamal dentro de una cubeta (sin horadaciones), frotar los granos y transferirlos manualmente a otra cubeta con agua limpia, y así sucesivamente hasta que el agua de lavado quede libre de turbiedad. Aun una pequeña cantidad de cal puede impartir un sabor picante al pozol.

Segunda cocción o "reventado". Esta operación representa la diferencia más importante entre el "pozol indígena" y el "pozol ladino". El reventado consiste en cocer el nixtamal



**Figura 4.1** Regiones geográfico-políticas de Chiapas: centro 1, Altos 2, Fronteriza 3, Frailesca 4, Norte 5, Selva 6, Sierra 7, Soconusco 8, Costa 9. El presente estudio se realizó en la zona sombreada



**Figura 4.2** Lavado de nixtamal en un río

en agua hasta que el grano de maíz "revienta" o "florece" y sólo la llevan a cabo los productores ladinos.

El tiempo de cocción varía entre 3 y 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol. A mayor tiempo de cocción el pozol resultante tiene un mayor contenido de humedad. Por lo general esta operación consiste en una ebullición vigorosa durante la primera hora, seguida de un hervor lento el resto del tiempo.

Presumiblemente, esta etapa adicional es innovación ladina. De hecho, una antigua vendedora de pozol explicó que a los indígenas les agrada un rezago o sedimento chicloso que puede masticarse y que queda después de beberlo. Este material fibroso del grano no es del agrado de los ladinos, quienes lo denominan "chincastito".

Para los ladinos, el proceso de reventar el nixtamal previamente a la elaboración resulta en un pozol más terso, menos "masoso" y en el que se elimina casi en su totalidad el desagradable "chincastito". Para los indígenas, sin embargo, el pozol reventado "no sirve".

Leyva (1988) asegura que la evolución cultural ha hecho que el patrón de alimentación sea cada vez más complicado: el prestigio social impone sus reglas. En el caso del pozol ladino la etapa de reventado busca hacer un producto más "fino". De hecho, existe un tipo de pozol orientado a satisfacer el paladar de la "clase alta" de San Cristóbal. Este tipo de pozol incluye en su elaboración, además del reventado, el despuntado del maíz antes de la molienda. Así es posible obtener un producto completamente blanco y terso.

**Remojo.** Esta fase precede a la molienda y se lleva a cabo, en el caso del pozol indígena, incluyendo el agua del último lavado del nixtamal (en frío); el pozol ladino se remoja con el agua de reventado (en caliente). Por lo general el remojo dura toda la noche y su objetivo es aumentar la retención de humedad para evitar que el maíz se seque durante la molienda.



**Molienda.** Esta operación se lleva a cabo a la mañana siguiente de la nixtamalización o del reventado. Los indígenas la realizan siempre en molino de mano con el que todos cuentan, sean o no vendedores de pozol, ya que todos son consumidores, sin excepción.

Entre los ladinos lo común es llevar a moler los granos a un molino de nixtamal comercial. Durante el trayecto del molino a la casa habitación el nixtamal no se cubre para protegerlo. Los que producen cantidades menores utilizan molino de mano y por tradición los de edad mayor utilizan piedra (metate). Generalmente, los indígenas agregan agua al nixtamal durante la molienda, en poca cantidad y con la mano. El productor ladino sólo agrega agua cuando el tiempo de reventado y remojo fue muy corto (si éste fue prolongado, se obtiene un pozol con demasiada humedad). El molino de mano se fija a una mesa, dentro de la cocina, y la masa obtenida se acumula directamente en la mesa, generalmente humedecida previamente (Figura 4.3). El molino comercial puede ser de discos de piedras o de metal. El grado de molienda se regula con una llave común tipo mariposa y el molinero sabe por experiencia qué nivel se requiere para los diferentes productos que se elaboran de nixtamal. Según los productores y los consumidores, la molienda en piedra proporciona un sabor característico al pozol, que no se obtiene con ningún otro método. Con este sistema de molienda se requiere un mínimo de dos moliendas para obtener la consistencia deseada. Resulta importante destacar que durante la molienda se presentan focos potenciales de contaminación microbiana. Por ejemplo, los molinos de mano jamás se desarmen para su limpieza. Es común desechar la primera "tapa" de masa que sale, ya que "huele" y este olor es inaceptable en el producto. Por su parte, los molinos comerciales se limpian una vez al día, al término de la jornada. Esta limpieza consiste en un simple "raspado" en seco de la masa que queda adherida en el molino. La piedra se enjuaga con agua después de su uso, nunca con jabón, y debido a que en su superficie áspera y desigual se acumulan residuos susceptibles al ataque microbiano.

**Elaboración de la bola.** Inmediatamente después de la molienda se forman bolas a mano con la masa previamente amasada de manera vigorosa durante poco tiempo (40-80 seg). Las bolas se elaboran moldeando la masa con las dos manos o sobre la mesa. Generalmente la mesa se enjuaga previamente con agua. Durante la formación de la bola, todos los indígenas y algunos ladinos utilizan agua para hidratar la masa. Tanto la manipulación de la masa como el agua agregada en esta etapa pueden ser, al igual que la molienda, fuentes importantes de inóculo para la fermentación.

La temperatura de las bolas de pozol varía de acuerdo con el tipo de proceso. En el pozol indígena la temperatura se mantiene al ambiente desde el lavado del nixtamal. En el caso del ladino, la temperatura varía dependiendo del tiempo de remojo del maíz reventado; el maíz se deja en remojo en la misma agua caliente en la que se llevó a cabo la cocción, pero en algunos casos se retira del fuego y en otros se deja sobre la brasa. Así, la temperatura interna de las bolas terminadas varía de 20 a 27 °C y la externa de 20 a 24 °C.

La forma y el peso de las bolas es variable entre productores. La forma puede ser ovalada o redonda, mientras que el peso puede estar en el intervalo de 15 gramos a 1 kilogramo, siendo el pozol indígena el de mayor peso.

**Envoltura.** Una vez amasado, el pozol se envuelve tradicionalmente en hojas de plátano (Figura 4.4), pero es común encontrarlo en el mercado cubierto con bolsas de plástico (varias bolas en una bolsa de plástico). Los indígenas argumentan que la hoja retarda la acidificación del pozol; no obstante, la bolsa de plástico se prefiere hoy en día por economía y menor peso. Esto es de suma importancia, ya que para transportar el pozol hasta el mercado de San Cristóbal, los comerciantes caminan largas distancias con cargas que suelen pesar 40 Kg. Esta carga se soporta en la frente con una red. Además, la

envoltura en hoja aumenta el volumen del producto, lo que reduce la capacidad de manejo de carga. Asimismo, las líneas de autotransporte cobran adicionalmente por cada unidad de carga. Sin embargo, al usar bolsas de plástico se condensa vapor de agua durante el trayecto, de manera que el pozol se acidifica. Esto reduce la aceptación por parte de los consumidores. Los ladinos por el contrario, explican que prefieren la bolsa de plástico porque protege del polvo y el pozol no adquiere gusto ácido tan rápidamente. Esto, que parece contradictorio, se debe probablemente a que el producto mestizo no se transporta largas distancias y por lo tanto no se fermenta como el indígena.

**Fermentación.** La mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco, es decir, consumen preferentemente el pozol que se preparó el mismo día. De hecho, este pozol, aunque no es muy ácido, ya presenta cierto grado de fermentación. El tiempo que transcurre entre su preparación (envoltura) y su consumo (aproximadamente 8 horas) es suficiente para que las bacterias lácticas responsables de la acidificación alcancen su máximo desarrollo (ver Capítulo 6).

Entre los indígenas es más frecuente el consumo de pozol maduro o agrio, sobre todo por los hombres que realizan trabajos pesados (peones, campesinos) porque "les da energía para trabajar". La maduración, que consiste en dejar las bolas de pozol envueltas en hojas de plátano a temperatura ambiente, tiene generalmente una duración máxima de 4 días. Algunas personas lo fermentan hasta 8 o 9 días y lo consumen cuando ya presenta un notorio crecimiento superficial de mohos.



Figura 4.3 Molienda de nixtamal en molino de mano, proceso indígena.

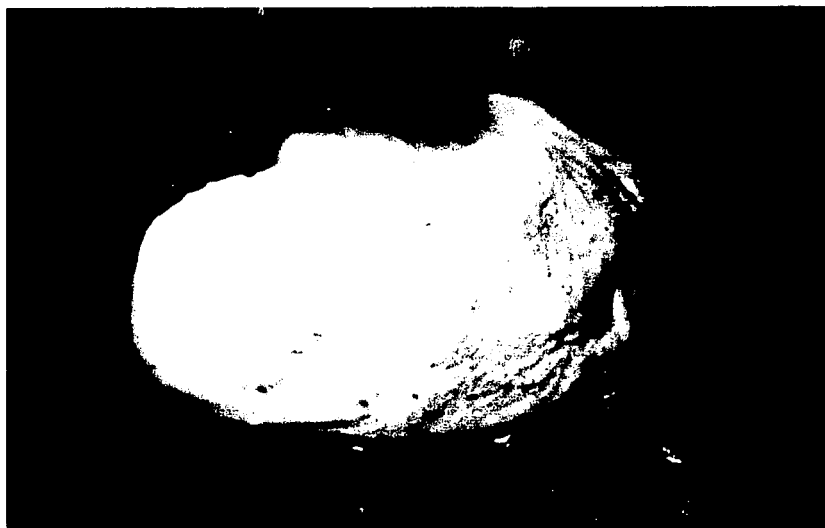


Figura 4.4 Pozol indígena envuelto en hojas de plátano

## **El producto final**

Concepto empírico de calidad. Existe la opinión unificada entre productores y consumidores, tanto indígenas como mestizos, que el pozol descompuesto es aquél que "hace hilos" y consideran que esto sucede debido a un agriado "no natural". Esto podría deberse al desarrollo de bacterias productoras de polímeros. Dentro de éstas se encuentran algunas bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* y otras del género *Bacillus* (ver Sección 4.2). Fuera de esta opinión los conceptos son variables: para los indígenas el pozol ladino no sirve y para los ladinos el pozol indígena no es pozol, sino nixtamal. Varios productores mencionaron que el producto se descompone cuando aparecen puntos rojos en la masa y que esto sucede cuando se guarda en bolsa de plástico y no en hoja. Esto puede deberse al crecimiento de bacterias (como *Serratia marcescens*) o levaduras productoras de pigmentos, como las del género *Torula*, o de ciertos hongos, como *Neurospora sitophila*, conocido como el hongo rojo del pan (Jay, 1992). Otros aseguran que el pozol muy húmedo (al que se le agregó demasiada agua durante la molienda o cuya segunda cocción fue muy prolongada) se descompone fácilmente. Algunos consideran que la aparición de mohos o hasta el agriado es signo de deterioro; otros en cambio señalaron que el pozol nunca se descompone.

Consumo de pozol. Para preparar el pozol se suspende la masa en agua disgregándola con la mano. La forma de consumir pozol es muy diferente entre los indígenas, que lo beben sin añadir otros ingredientes; en cambio, los ladinos siempre agregan azúcar y comúnmente hielo. El pozol que más consumen los ladinos es el blanco y el de chocolate, que preparan agregando a la masa cacao previamente tostado y molido antes de formar la bola. Por su parte, los indígenas nunca consumen pozol con cacao. Los indígenas consumen los tres tipos de pozol (blanco, amarillo y negro) por igual, sin preferencia,

aunque piensan que el amarillo y el negro tienen más "vitaminas". Mantienen marcadamente el consumo de pozol como alimento base, pero la publicidad ha penetrado hasta lo más íntimo de las comunidades, distorsionando este tipo de hábitos. Por ejemplo, es bien sabido que los chamulas incluyen Coca Cola en sus ritos religiosos.

#### **4.1.2.4 CONCLUSIONES**

Existe homogeneidad en el concepto de pozol, a pesar de las variaciones en los procesos de elaboración de los diferentes productores. Mediante este estudio fue posible destacar detalles y diferencias importantes entre los procesos, que no habían sido señalados anteriormente:

1. Existen dos tipos básicos de pozol, en función de factores culturales y sociales del productor: "ladino" e "indígena".
2. Existen diferencias en el proceso de elaboración de pozol, que influyen en las características del producto final, como son: el tipo de maíz y su grado de madurez; la adición de otros componentes a la masa de nixtamal; la presencia o ausencia de la segunda cocción o "reventado" de los granos y el tipo de envoltura.
3. La variación más importante es el "reventado" de los granos de nixtamal. Ésta marca la diferencia entre el pozol "indígena" y el "mestizo" y es probable que afecte, de manera importante, el arraigo de diferentes micropoblaciones tipo durante la fermentación de la masa.

## **4.2 MICROBIOLOGÍA DEL POZOL**

### **4.2.1 INTRODUCCIÓN**

La masa de nixtamal sufre una fermentación "natural", es decir, no se añade ningún inóculo ni una porción de alimento fermentado a la masa recién preparada, sino que actúan los microorganismos presentes en forma natural. El tipo de fermentación que sufra el sustrato dependerá entonces de los tipos de microorganismos iniciales y de sus proporciones relativas.

La mayor parte de los estudios microbianos realizados sobre el pozol se han centrado en describir su micoflora (Ulloa, 1974; Ulloa y Herrera, 1976-1982; Ulloa y col., 1983; Ulloa y col., 1987), pero las bacterias han sido menos estudiadas (Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado, 1988; Silva-Villarreal, 1984; Nuraida, 1988). Siendo la acidificación de la masa una de sus principales características, la fermentación láctica, que es esencial; no ha sido estudiada con suficiente detalle.

Se plantearon entonces como objetivos para esta parte del estudio:

1. Determinar cuáles son los principales grupos de microorganismos involucrados en la fermentación del pozol.
2. Determinar si están presentes los diferentes grupos microbianos en diferentes tipos de masas y en diferentes lotes de masas del mismo productor, y si existen variaciones en sus números iniciales.
3. La caracterización de las bacterias más abundantes o representativas del proceso.

### **4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizaron estudios en dos lugares del estado de Chiapas: San Cristóbal de las Casas y Tapachula.

San Cristóbal de las Casas. Se seleccionaron un productor indígena y uno mestizo de entre los entrevistados en el estudio anterior (Sección 4.1). Se obtuvieron de cada uno

bolas de pozol recién elaborado (inmediatamente después de moldear las bolas), cuyos procesos de elaboración se muestran en la Figura 4.5. Se colocaron en bolsas de plástico nuevas, se transportaron al laboratorio dentro de una hielera y se analizaron inmediatamente (el tiempo transcurrido entre el moldeo y el análisis fue de una hora).

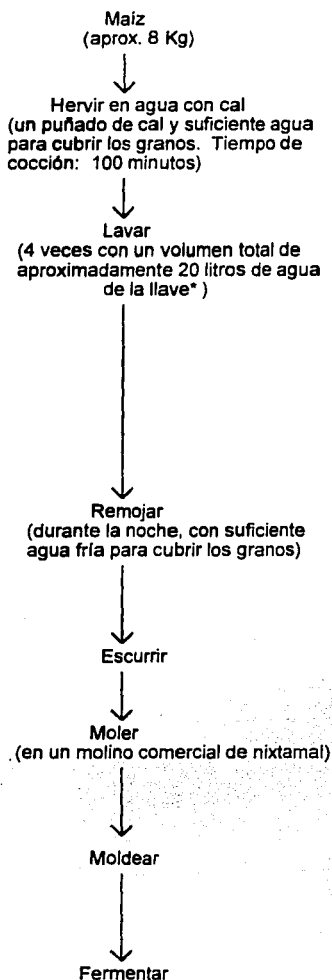
Se recolectó una bola por productor cada día durante 9 días consecutivos y se tomaron muestras de la superficie (hasta una profundidad máxima de 2 mm) y del interior de las bolas con espátula estéril. Se realizaron cuentas viables de bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias mesófilas no lácticas, mohos y levaduras, y se midió el pH del interior de cada bola (ver Materiales y Métodos generales). Se aislaron y caracterizaron bacterias lácticas, enterobacterias y bacterias mesófilas no lácticas (ver Materiales y Métodos generales).

**Tapachula.** De un productor mestizo se obtuvieron una muestra de pozol elaborado con maíz blanco y otra con maíz blanco y cacao (a la que se le añadió cacao tostado y molido durante la molienda), inmediatamente después del moldeo de las bolas. Los procesos de elaboración se muestran en la Figura 4.6. Se analizaron de la misma manera que los pozoles de San Cristóbal de las Casas. Se aislaron y caracterizaron bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas y enterobacterias, como en el caso anterior, pero de muestras tomadas en diferentes etapas durante la elaboración de la masa.

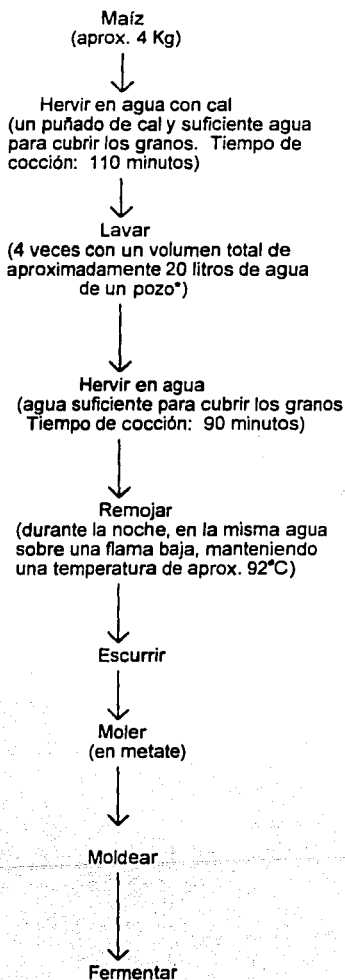
**Análisis estadísticos.** Se realizó un análisis de varianza con el programa SPSS para determinar si existían diferencias significativas entre las cuentas microbianas de los pozoles indígena y mestizo de San Cristóbal de las Casas.



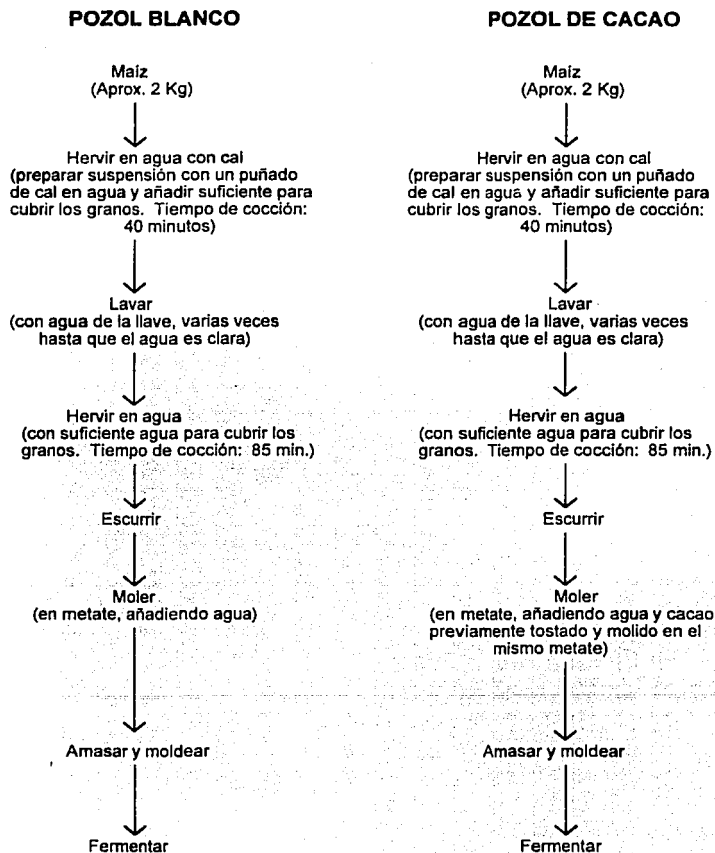
## PROCESO INDÍGENA



## PROCESO MESTIZO



**Figura 4.5** Procesos indígena y mestizo de elaboración de pozol en San Cristóbal de las Casas. \* Una comunidad de familias indígenas, que vivían en San Cristóbal de las Casas, compartían un sólo grifo de agua. El productor mestizo tenía un pozo en su casa.



**Figura 4.6** Proceso mestizo de elaboración de pozoles blanco y de cacao en Tapachula.

## **4.2.3 RESULTADOS**

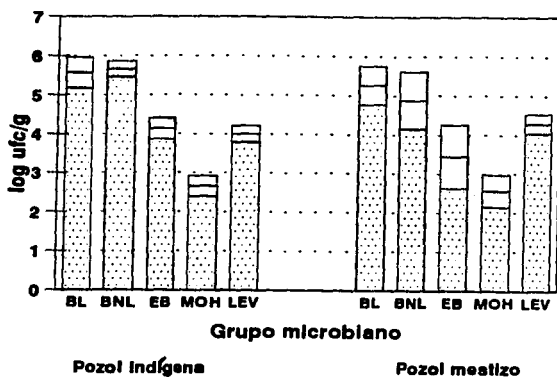
### **4.2.3.1 Números de microorganismos presentes en las masas recién elaboradas.**

En la Figura 4.7A se presentan las cuentas de varios grupos microbianos en masas recién amasadas y moldeadas de pozol blanco de un productor indígena y de otro mestizo de San Cristóbal de las Casas. La región blanca de cada barra representa la desviación estándar y la línea central el promedio de los valores obtenidos en los 9 días consecutivos. En la Figura 4.7B se muestran los valores obtenidos para los pozoles blanco y de cacao del productor mestizo de Tapachula. En los 4 tipos de pozol se detectaron bacterias lácticas, bacterias mesófilas aerobias no lácticas, enterobacterias y mohos; no se detectaron levaduras en el pozol de cacao de Tapachula pero sí en los demás.

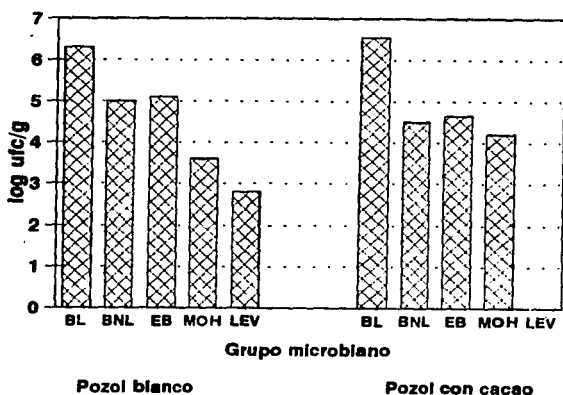
En el caso de los pozoles de San Cristóbal, en los que se examinaron muestras durante 9 días consecutivos, no se detectaron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las cuentas de cada grupo microbiano de las 9 muestras de masas indígenas y ni de las 9 muestras de masas mestizas. Tampoco existieron diferencias significativas entre las cuentas de cada grupo microbiano de estos dos tipos de pozol, a pesar de las diferencias en sus procesos de elaboración y del hecho de que cada tipo fue elaborado por un productor diferente. Las cuentas iniciales de los mismos grupos microbianos de pozoles elaborados en una región distante (Tapachula) también resultaron similares entre dos tipos de masas (blanca y de cacao) de un mismo productor y a su vez similares a las de los pozoles de San Cristóbal de las Casas.

El grupo de las bacterias lácticas es el que tiende a predominar en número. Las cuentas iniciales en todos los tipos de pozoles fueron de alrededor de  $10^6$  ufc/ g. Con respecto al resto de las bacterias, las mesófilas no lácticas se encontraron también en números elevados y similares a las de las lácticas, y las enterobacterias en números cercanos a  $10^4$  ufc/g. Las cuentas de mohos y levaduras fueron más bajas, más variables y en ocasiones muy cercanas al límite de detección ( $10^2$  ufc/g).

## A: SAN CRISTÓBAL



## B: TAPACHULA



**Figura 4.7** Cuentas iniciales de bacterias lácticas (BL), bacterias mesófilas no lácticas (BNL), enterobacterias (EB), mohos (MOH) y levaduras (LEV) en masas recién moldeadas de pozoles indígena y mestizo de San Cristóbal (A) y blanco y de cacao de Tapachula (B). No se detectaron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en las cuentas de cada grupo microbiano entre los pozoles indígena y mestizo de San Cristóbal, ni entre las 9 muestras de pozol indígena ni entre las 9 de pozol mestizo del mismo lugar. La región blanca es la desviación estándar y la línea central es el promedio.

#### 4.2.3.2 Caracterización de las bacterias del pozol

**Bacterias lácticas.** Se obtuvieron 31 aislamientos de bacterias lácticas del pozol mestizo de Tapachula (de un sólo lote de masa), 24 de 3 lotes de masa del pozol indígena de San Cristóbal y 19 de 3 lotes de masa del mestizo de San Cristóbal. En el caso de los aislamientos de los pozoles de San Cristóbal, no se distinguió de cuál de los 3 lotes provenía cada aislamiento. Como se muestra en la Tabla 4.2, en todos se encontraron los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* en mayor proporción, encontrándose el último en números ligeramente mayores que el primero. En los pozoles mestizos se detectó el género *Lactobacillus*, en menor proporción que los anteriores y en el indígena algunas cepas de *Pediococcus*.

Se detectó una pequeña proporción de cepas amilolíticas, de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* (Tabla 4.2). Se puede observar también que existieron variaciones con respecto a esta característica en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, encontrándose una mayor proporción de cepas capaces de hidrolizar el almidón en ausencia de oxígeno.

Se encontraron mayores proporciones de cepas heterofermentativas que de homofermentativas en los pozoles mestizos, con una predominancia de las segundas en el de San Cristóbal. La proporción entre ambas fue muy similar en el pozol indígena.

**Enterobacterias.** Se aislaron 26 cepas de los pozoles mestizos de Tapachula: 13 del pozol indígena y 5 del mestizo de San Cristóbal. Los aislamientos de los pozoles de Tapachula provenían de un lote de masa y los de San Cristóbal de 3 lotes de masa. En el caso de los aislamientos de los pozoles de San Cristóbal, no se distinguió de cuál de los 3 lotes provenía cada aislamiento. El total de los aislados de Tapachula correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, mientras que de los de San Cristóbal se aislaron además

*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans* y *Escherichia coli* (Tabla 4.3).

**Bacterias mesófilas aerobias no lácticas.** Las características de las bacterias de este grupo, de las que se aislaron aproximadamente 20 por muestra, fueron siempre: Gram positivo, catalasa positiva y esporuladas, que corresponden a las del género *Bacillus*.

**Tabla 4.2** Características de las bacterias lácticas aisladas del pozol

Género tentativo *	POZOL MESTIZO ** Tapachula					POZOL INDÍGENA ** San Cristóbal					POZOL MESTIZO ** San Cristóbal				
	No. de aislados	Producción de gas a partir de glucosa		No. de cepas amilasa +		No. de aislados	Producción de gas a partir de glucosa		No. de cepas amilasa +		No. de aislados	Producción de gas a partir de glucosa		No. de cepas amilasa +	
		- homofermentativas	+ heterofermentativas	En cond. aeróbicas	En cond. anaeróbicas		- homofermentativas	+ heterofermentativas	En cond. aeróbicas	En cond. anaeróbicas		- homofermentativas	+ heterofermentativas	En cond. aeróbicas	En cond. anaeróbicas
<i>Lactobacillus</i>	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>Lactococcus</i>	11	11	0	5	5	9	9	0	0	1	3	3	0	2	2
<i>Leuconostoc</i>	16	0	16	0	0	11	0	11	1	1	15	0	15	1	2
<i>Pediococcus</i>	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
No. Total	31	12	19	5	5	24***	14	11	1	2	19***	3	16	3	5

\* *Lactobacillus*: bacilos homo o heterofermentativos

*Lactococcus*: cocos homofermentativos, dextrana positivo o negativo

*Leuconostoc*: cocos heterofermentativos, productores de dextrana

*Pediococcus*: cocos en tétrades, homofermentativos, dextrana negativos

Pruebas bioquímicas de cada cepa en Apéndices 1 y 2

\*\* Los aislamientos se hicieron de una muestra en el caso del pozol de Tapachula y de tres muestras en el de los de San Cristóbal

\*\*\* Número total de cepas aisladas de las 3 muestras.

**Tabla 4.3 Enterobacterias aisladas del pozol**

Especie *	No. de cepas aisladas		
	POZOL MESTIZO ** Tapachula	POZOL INDIGENA ** San Cristóbal	POZOL MESTIZO ** San Cristóbal
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	0	2
<i>Citrobacter freundii</i>	0	5	2
<i>Serratia marcescens</i>	0	7	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0
No. total	26	13***	5***

\* Pruebas bioquímicas de cada cepa en Apéndices 3 y 4

\*\* Los aislamientos se hicieron de una muestra en el caso del pozol de Tapachula y de tres muestras en el de los de San Cristóbal

\*\*\* Número total de cepas aisladas de las 3 muestras



## 4.2.4 DISCUSIÓN

### 4.2.4.1 Números de microorganismos presentes en masas recién elaboradas

Es común encontrar en los alimentos fermentados de origen vegetal los grupos microbianos que se detectaron en el pozol (Daeschel y col., 1987). Los números de bacterias lácticas son normalmente muy pequeños (Chunjian y col., 1992; Gatumbi y col., 1983). En cambio, las enterobacterias y otros microorganismos aerobios predominan al inicio de fermentaciones de ensilados (Woolford, 1972), de verduras (Fleming, 1982), de panes agrios (Oura y col., 1982; Gashe, 1985) y de atoles fermentados (Gatumbi y col., 1983).

A diferencia de todos estos alimentos, la elaboración del pozol incluye un tratamiento térmico alcalino de los granos antes de la fermentación, durante el cual se reduce notablemente su microbiota natural. La inoculación de la masa entonces debe ocurrir después de la nixtamalización y a eso se debe que las proporciones de los grupos microbianos sean diferentes. Al existir varias posibles fuentes de inoculación de la masa después de la nixtamalización, se esperaría que el tipo de microorganismos al iniciar la fermentación fuera muy variable; sin embargo se observó que la microbiota inicial es muy constante. Hesseltine y Wang (1986) mencionan que uno de los aspectos importantes de las fermentaciones tradicionales, que se han producido durante siglos, es que en ellas se han seleccionado y establecido durante todo ese tiempo los microorganismos responsables de producir las características deseables en el alimento. Wood (1983) enfatiza la efectividad en el proceso de selección de microorganismos explicando que la microbiota de masas agrias producidas en diferentes partes del mundo es muy similar. Se aislaron los mismos tipos de microorganismos (*Lactobacillus sanfrancisco* y *Torulopsis holmii*) de masas de Glasgow, en el Reino Unido, de Polonia y de San Francisco, en Estados Unidos. Halm y col. (1993) reportan uniformidad en la microbiota de diferentes muestras de *kenkey*, alimento fermentado de maíz que se consume en Ghana, África. Viniegra-

González y Gómez (1984) sugieren que la relación C/N (carbohidrato/proteína) y el pH definen el tipo de fermentación y por lo tanto la microbiota de un alimento fermentado.

Por los resultados obtenidos, es posible sugerir que en el pozol ha ocurrido un proceso de selección similar al reportado para otros alimentos fermentados, por lo que su microbiota es muy constante.

#### 4.2.4.2 Caracterización de las bacterias del pozol

**Bacterias lácticas.** En el pozol se encontraron los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Se detectó una tendencia de predominio de bacterias heterofermentativas, y dentro de ellas las del género *Leuconostoc*. En un trabajo previo de nuestro grupo se encontró también una predominancia de *Leuconostoc* en masas en fermentación (Nuraida, 1988).

Las bacterias del género *Leuconostoc* predominan en plantas (Daeschel y col., 1987). Inician fermentaciones produciendo acidez y aromas y en algunos casos acción leudante, y debido a su poca tolerancia a la acidez son reemplazadas por otras cepas más resistentes, como *Lactobacillus plantarum* (Okafor, 1977; Ngaba y Lee, 1979; Okafor y col., 1984; Onyekwere y col., 1989; Ofuya y Nnajifor, 1989; Oyewole y Odunfa, 1990; Oyewole, 1990; Fleming, 1982; Christian y Nyako, 1983; Pederson, 1983). *Lactobacillus*, al ser homofermentativo, es generalmente el principal responsable de la acidificación. El tipo de microbiota láctica varía en cada alimento y en función del tipo de bacterias encontradas en el pozol es probable que inicien las cepas de *Leuconostoc*, para luego ser reemplazadas por otras más resistentes a la acidez.

Uno de los aspectos que determinan el desarrollo de estas bacterias, cuya actividad en el pozol es esencial, es su capacidad para fermentar el sustrato. El carbohidrato que se encuentra en mayor proporción en el maíz es el almidón, por lo que las bacterias con la capacidad de hidrolizarlo podrían tener ventajas sobre las demás para desarrollarse en el nixtamal. Se encontró, coincidiendo con las observaciones de Velázquez-Corona y col.

(1984), que una proporción pequeña de las bacterias aisladas poseía actividad amilolítica, incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Velázquez-Corona y col. (1994) aislaron del pozol cepas amilolíticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

La conversión de almidón en ácido láctico no es una característica común de las bacterias lácticas; sin embargo se ha demostrado que las especies *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus cellobiosus* son capaces de hacerlo (Giraud y col., 1993a).

Es interesante notar que aunque la mayoría de las cepas amilolíticas aisladas mostraron esta actividad, tanto en condiciones aeróbicas como en las anaeróbicas, en algunas se detectó sólo en ausencia de aire. Esto es importante, dado que en el pozol debe existir heterogeneidad en cuanto a la disponibilidad de oxígeno (es posible que en la superficie de las bolas de masa exista más oxígeno que en el interior de las mismas).

La segunda cocción del proceso mestizo no influyó sobre la composición de la microbiota láctica, posiblemente porque la entrada de microorganismos a los granos ocurre después de el (o los) tratamiento(s) térmico(s) de los granos.

Enterobacterias. Es común la presencia de enterobacterias al inicio de fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta, así como la transmisión de estos microorganismos por contaminación fecal. Siendo el pozol un alimento muy manipulado, sobre todo durante la molienda, el amasado y el moldeado, los cuales además se realizan en condiciones poco higiénicas, sería muy probable que estuvieran presentes en la masa enterobacterias patógenas. Sin embargo, no se detectaron éstas en los distintos tipos de pozol. Se encontró únicamente un aislado cuyas pruebas bioquímicas coincidieron con las de *E. coli* y para el que habría que determinar si pertenece a alguno de los grupos patógenos de esta especie. Las siembras se hicieron directamente sobre un medio

selectivo (Agar rojo violeta bilis glucosa), que no permite detectar bacterias dañadas, por lo que para la determinación de estos patógenos sería necesario realizar las técnicas que incluyeran las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo.

Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988) reportan abundantes bacterias Gram negativas al inicio de la fermentación de pozoles elaborados en su laboratorio. En un estudio sobre la calidad sanitaria de tortillas en un pueblo indígena de Guatemala (Capparelli y Mata, 1975), se encontró que éstas contenían de  $10^3$  a  $10^7$  coliformes/g, dentro de los que aislaron *Klebsiella* sp. y *E. coli*; sin embargo, aunque sí se detectaron patógenos que no pertenecen a este grupo (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), no reportaron *Salmonella* ni *Shigella*.

Las especies encontradas en el pozol se han detectado también en otros alimentos fermentados y en ocasiones se les atribuye alguna función, como el ablandamiento de tubérculos (Oyewole, 1990), la acidificación (Gashe, 1985) y la producción de vitaminas (Steinkraus, 1983; Keuth y Bisping, 1993).

Salinas y Herrera (1974) aislaron del pozol *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*), capaz de fijar el nitrógeno atmosférico. A esta bacteria, junto con *Agrobacterium azotophilum*, se le ha atribuido una participación importante en el aumento en la concentración de proteína durante la fermentación de este alimento (Taboada y col., 1975; Leal y col., 1987).

Al igual que en el caso de la microbiota láctica, la segunda cocción del proceso mestizo no influyó sobre la composición de las enterobacterias, posiblemente porque el (o los) tratamiento(s) térmico(s) de los granos destruyen, en ambos procesos, a los microorganismos presentes en el maíz. La inoculación natural debe ser entonces posterior a la ebullición de los granos y similar para los procesos indígena y mestizo.

Bacterias mesófilas aerobias no lácticas. Estas bacterias, que frecuentemente son amilolíticas, podrían jugar un papel importante en la fermentación promoviendo el crecimiento de las bacterias lácticas, pero el género *Bacillus* incluye especies reportadas como patógenas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*), por lo que en general se consideran indeseables. *Bacillus cereus* ha sido aislada del pozol (Salinas, 1958), pero no se ha demostrado si se producen toxinas en el mismo. Por ser esporuladas presentan resistencia a tratamientos térmicos, por lo que sería de interés estudiar su sobrevivencia a la nixtamalización.

#### 4.2.5 CONCLUSIONES

Se cuantificaron los grupos microbianos más abundantes en las masas de nixtamal recién preparadas y se caracterizaron algunos grupos bacterianos. Mediante este estudio fue posible conocer la microbiota bacteriana inicial en la fermentación del pozol y su variabilidad, así como inferir su posible participación en el proceso:

1. Los grupos de microorganismos que se encuentran sistemáticamente en la masa de pozol recién preparada son: bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias mesófilas no lácticas (*Bacillus*), mohos y levaduras.
2. Las cuentas de cada uno de estos grupos en las masas recién elaboradas del mismo productor, de diferentes productores de la misma región, y aun de productores de diferentes regiones, son muy similares (Figura 4.7). Se infiere que la microbiota del pozol es muy estable.

3. Aparentemente, la diferencia del proceso ladino o mestizo y el indígena no influye en la composición bacteriana del pozol. Esto se debe posiblemente a que durante los tratamientos térmicos de ambos tipos de procesos se eliminan los microorganismos presentes en los granos de maíz y posteriormente ocurre una inoculación natural, que es semejante en ambos procesos.

4. Se encuentran bacterias lácticas tanto homo como heterofermentativas en la masa del pozol, y las del género *Leuconostoc* tienden a predominar, por lo que deben jugar un papel importante en la fermentación.

5. Se aislaron bacterias lácticas amilolíticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Estas deben jugar un papel importante en la fermentación, debido al carácter amiláceo del sustrato.

6. Se encuentran otros grupos, como el de las enterobacterias ( $10^3$  -  $10^5$  ufc/g) y *Bacillus* ( $10^4$  -  $10^6$  ufc/g), los cuales debido a la patogenicidad de algunos de sus miembros se consideran indeseables.

## Capítulo 5

# INCORPORACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL POZOL

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación del pozol no se añade ningún inóculo, ni una porción de alimento previamente fermentado, sino que el proceso depende del tipo y de la cantidad de microorganismos naturalmente presentes en la masa. En el capítulo anterior se determinó que tanto el tipo como la cantidad de microorganismos presentes en las masas recién moldeadas es muy constante. Si se considera que el momento en que se termina de moldear la bola de masa como el tiempo de inicio de la fermentación, los números iniciales de bacterias lácticas son elevados (entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g de masa), pero también son altos los números de bacterias no lácticas ( $10^4$ - $10^6$  ufc/g) y de enterobacterias ( $10^3$ - $10^5$  ufc/g). La función de estos últimos en esta fermentación no ha sido determinada y se consideran indeseables por incluir especies patógenas.

Como parte del estudio global sobre la microbiología del pozol, se realizó una investigación con el objeto de identificar las fuentes de bacterias lácticas y de contaminantes indeseables en la masa. Por considerarlos como los más probables, se evaluó la contribución de las etapas de remojo, molienda, manipulación de la masa en el moldeo y de la contaminación atmosférica.

### 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.2.1 Diseño experimental

El diseño experimental se muestra en la Figura 5.1. Se determinaron la microbiota y el valor de pH de las muestras en todas las etapas de procesamiento (remojo, molienda,

moldeo y contaminación del aire) para determinar la contribución de cada etapa en la microbiota del pozol indígena. Todos los muestreos se realizaron en la casa del Sr. Javier Santis Gómez (productor de pozol tipo indígena), en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, excepto donde se indica.

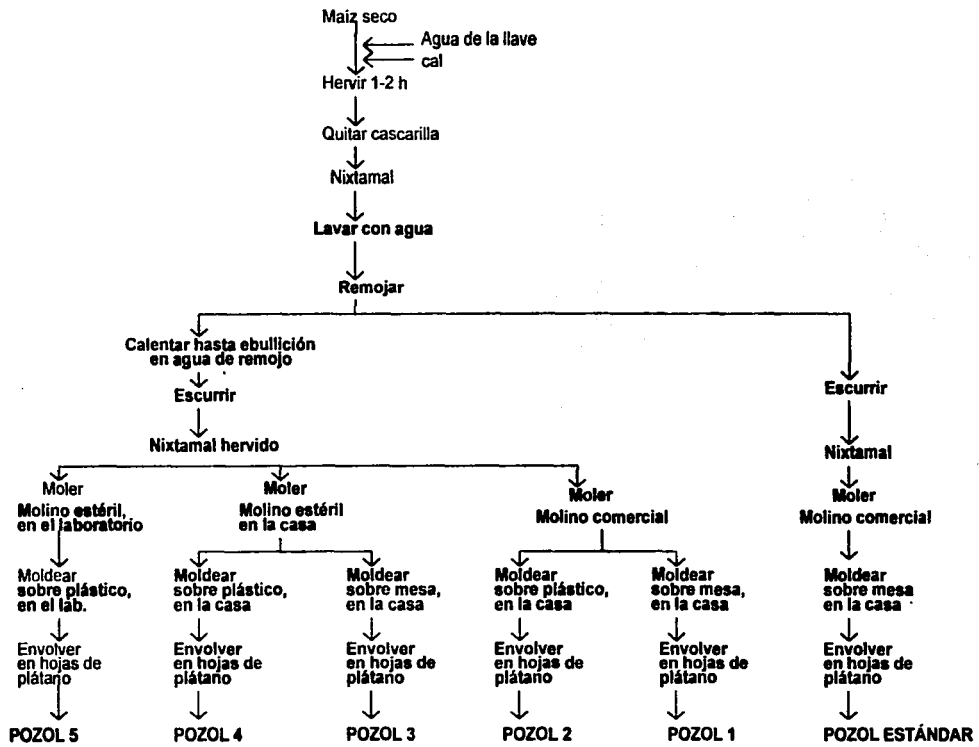
### **5.2.2 Preparación de pozol estándar por el método tradicional**

Se añadieron a aproximadamente 8 Kg de maíz blanco (adquirido en el mercado de San Cristóbal de las Casas) un puño de cal y agua de la llave, para cubrir los granos. Se hirvió esta mezcla hasta que las cascarillas de los granos podían desprenderse fácilmente (aproximadamente 1.5 h) (Figura 5.2). El pH del agua después de esta cocción fue de 11.7. Se decantó el líquido, se añadió agua de la llave y se frotaron los granos con la mano para desprender las cascarillas. Se lavaron los granos dos veces con agua de la llave limpia (un total de cerca de 20 l)(Figura 5.3) y se dejaron remojando en agua toda la noche. Se decantó el agua de remojo y los granos de nixtamal se molieron en forma gruesa en un molino de nixtamal comercial (Figura 5.4). La masa de nixtamal se moldeó en bolas que pesaron entre 80 y 130 g (peso húmedo) sobre una mesa de madera (Figura 5.5). Las bolas se colocaron en una bolsa de plástico y se llevaron al laboratorio, donde se envolvieron en hojas de plátano, que habían sido pasadas sobre la flama de un mechero, para hacerlas flexibles, y se incubaron a 28°C.

### **5.2.3 Preparación de pozol de nixtamal sujeto a una etapa adicional de cocción**

Aproximadamente la mitad del nixtamal preparado anteriormente se calentó a ebullición en el agua de remojo para eliminar los microorganismos presentes. El nixtamal hervido se escurrió y se usó para preparar los 5 diferentes lotes de pozol que se muestran en la Figura 5.1.





**Figura 5.1** Diseño experimental para identificar las fuentes de contaminación microbiana en la masa de pozol.

Parte del maíz molido y escurrido se molió en el molino comercial. La mitad de esta masa se moldeó a mano sobre la mesa de madera (Figura 5.5) (Pozol 1, Figura 5.1), como en el pozol estándar. La otra mitad se moldeó a mano, pero usando guantes de plástico limpios, sobre un plástico limpio que se colocó sobre la mesa de madera (Figura 5.6) (Pozol 2, Figura 5.1). Las bolas de estos pozoles 1 y 2 se colocaron en bolsas de plástico, se llevaron al laboratorio, se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 28°C.

La segunda parte del nixtamal hervido y escurrido se molió en un molino de mano (Comercializadora Corona, Tlalnepantla, México), que se había esterilizado previamente en autoclave, a 121°C, durante 20 minutos (Figura 5.7). La mitad de la masa recién molida se recolectó sobre la mesa de madera y se moldeó a mano sobre la mesa como en el caso del pozol estándar, para obtener el pozol 3 (Figura 5.1) y la otra mitad se recolectó sobre el plástico nuevo y se moldeó con las manos protegidas con guantes de plástico nuevos (pozol 4; Figura 5.1). Las bolas se colocaron en bolsas de plástico nuevas, se llevaron al laboratorio, se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 28°C.

Se colocó una tercera parte del nixtamal hervido y caliente en una bolsa de plástico nueva y se llevó al laboratorio, donde se molió en el molino de mano estéril. Se recolectó el material molido en una bolsa de plástico y se moldeó utilizando guantes de plástico nuevos, sobre un plástico nuevo (Figura 5.8). Se hizo todo lo posible para evitar contaminaciones en todas las etapas. Se envolvieron estas bolas, que corresponden al pozol 5 de la Figura 5.1, en hojas de plátano y se incubaron a 28°C.

#### **5.2.4 Muestreo**

Se tomaron muestras del interior de las bolas o de la masa en todas las etapas de preparación de los lotes de pozol y se almacenaron entre 0 y 5°C hasta que se analizaron (aproximadamente 2 horas). Se usó una bola diferente en cada muestreo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### **5.2.5 Determinación de poblaciones microbianas**

Se añadieron 10 gramos de masa (peso húmedo) y 90 ml de peptona al 0.1% (p/v) estéril (Bioxon 154-3) a una bolsa de plástico nueva. Se agitó la bolsa con la mano durante un minuto para homogenizar su contenido y se realizaron las diluciones requeridas en el mismo diluyente. Se determinaron las cuentas viables de bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas, enterobacterias, mohos y levaduras, así como el valor de pH de las masas de acuerdo con los procedimientos señalados en la sección de Materiales y Métodos Generales.



Figura 5.2 Cocción en agua con cal (nixtamalización) de los granos de maíz, en la casa del productor.



Figura 5.3 Lavado de los granos de nixtamal, en la casa del productor.



Figura 5.4 Molino comercial de nixtamal.



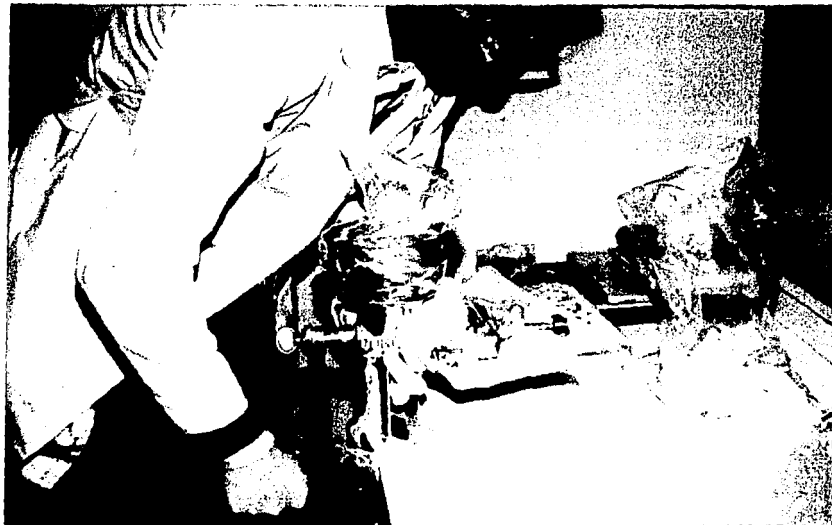
Figura 5.5 Moldeado de la masa sobre la mesa de madera (proceso tradicional), en la casa del productor.



**Figura 5.6** Moldeado en mesa cubierta con plástico limpio, usando guantes de plástico, en la casa del productor.



**Figura 5.7** Molienda con molino manual, mesa cubierta con plástico limpio y usando guantes de plástico, en la casa del productor.



**Figura 5.8** Molienda aséptica en el laboratorio, evitando cualquier tipo de contaminación.



**Figura 5.9** Espacios muertos del molino comercial, donde se acumula la masa que sirve como fuente de inóculo.

## **5.3 RESULTADOS**

### **5.3.1 Desarrollo de microorganismos en el pozol estándar**

Los números de microorganismos presentes durante las diferentes etapas de preparación de pozol estándar se muestran en la Tabla 5.1. Como se esperaba, no se detectaron microorganismos después de la cocción en agua con cal y después de lavar los granos permanecieron casi igual. No se detectó ninguno de los tipos de microorganismos evaluados al inocular 0.1 ml del agua de la llave utilizada durante el proceso en cada uno de los medios.

Durante la incubación de las bolas de masa se incrementaron los números de todas las bacterias hasta las 11 horas y luego tendieron a permanecer constantes hasta las 30 horas de incubación. El incremento de las bacterias lácticas fue proporcionalmente mayor que el de los otros grupos microbianos, para alcanzar una cuenta final de  $10^9$  ufc/g. Aunque el pH del pozol estándar bajó de un valor inicial de 7.3 a 4.6 después de 30 horas de incubación (Figura 5.10), los números de enterobacterias y de otras bacterias mesófilas permanecieron constantes entre las 11 y las 30 horas, de manera que no existieron evidencias de los efectos letales de las condiciones ácidas sobre estos microorganismos. Contrastando con esto, los números de levaduras se incrementaron substancialmente de las 11 a las 30 horas.

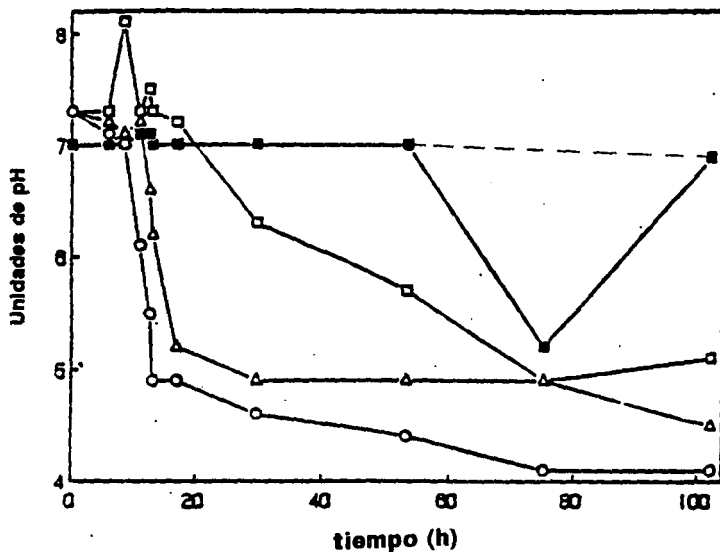
### **5.3.2 Efecto del remojo en la microbiota**

Durante el remojo las cuentas microbianas de los granos aumentaron considerablemente desde no detectable o en niveles muy bajos ( $<10^1$  a  $1.6 \times 10^2$  ufc/g) hasta  $10^1$  a  $10^4$  ufc/g (Tabla 5.1). En el agua de remojo los números fueron aún mayores: mesófilos aerobios,  $2.7 \times 10^5$  ufc/ml; bacterias lácticas,  $5.5 \times 10^4$ ; enterobacterias,  $2.5 \times 10^2$ ; y mohos y levaduras,  $<1 \times 10^3$ . El pH del agua de remojo fue de 8.5, mientras que el de los granos macerados fue de 7.2.



**Tabla 5.1** Concentraciones de microorganismos presentes en diferentes etapas durante la producción de pozol por el procedimiento tradicional (pozol estándar)

Etapa de procesamiento	Concentración microbiana (log <sub>10</sub> ufc/g de peso húmedo)				
	Bacterias lácticas	Bacterias mesófilas aerobias	Enterobacterias	Levaduras	Mohos
1. Granos de maíz hervidos con cal.	<1.0	<2.0	<1.0	<2.0	<2.0
2. Granos hervidos, descascarados y lavados.	2.2	<2.0	<1.0	<2.0	<2.0
3. Granos remojados.	3.0	4.5	1.6	<2.0	<2.0
4. Molienda.	4.8	4.3	2.2	2.9	<2.0
5. Bola de pozol incubada durante 6 h.	6.6	5.2	3.9	2.7	<1.0
6. Bola de pozol incubada durante 11 h.	8.8	6.7	5.9	4.8	<3.0
7. Bola de pozol incubada durante 14 h.	9.2	7.1	6.1	4.7	<3.0
8. Bola de pozol incubada durante 30 h.	9.3	6.8	5.8	6.4	4.2



**Figura 5.10** Cambio en los valores de pH de bolas de pozol elaboradas por diferentes métodos e incubadas a 28°C. O- pozol estándar, hecho con el método tradicional, molido en molino comercial y moldeado sobre mesa de madera; Δ- Pozol 1, granos de nixtamal hervidos, molidos en molino comercial y moldeados sobre mesa de madera; □- pozol 3, granos de nixtamal hervidos, molidos en molino estéril y moldeados sobre mesa de madera; y ■- pozol 5, granos de nixtamal hervidos, molidos en molino estéril y moldeados en condiciones asépticas en el laboratorio. No se presentan los datos de los pozoles 2 y 4, ya que son similares a los de los pozoles 1 y 3, respectivamente.

### **5.3.3 Efecto de la molienda en la microbiota**

La molienda añadió microorganismos a la masa, aumentando los números de bacterias lácticas de  $1 \times 10^3$  en los granos remojados a  $6.3 \times 10^4$  en la masa molida y los de levaduras de  $<10^2$  a  $8 \times 10^2$  (Tabla 5.1).

La molienda del nixtamal hervido, en el que se habían eliminado todos los microorganismos presentes, en el mismo molino comercial, inoculó la masa con números grandes de microorganismos, incluyendo bacterias lácticas, mesófilas aerobias, enterobacterias, mohos y levaduras (Tabla 5.2).

Mucha gente muele su nixtamal cada mañana, principalmente para hacer tortillas, en el molino comercial, sin limpiar la máquina entre cada lote. Al inspeccionar el molino se observó que retiene una gran cantidad de masa que podría servir como fuente de microorganismos (Figura 5.9). Además, la limpieza diaria consiste en desmantelar el molino y únicamente raspar los depósitos de masa, sin usar agua, asegurándose, sin intención, de que exista inóculo disponible para la molienda del siguiente día.

### **5.3.4 Efecto de la superficie de preparación en la microbiota**

Se realizó una cuenta de los microorganismos presentes sobre la superficie de la mesa de madera, incluyendo la de una grieta y se obtuvieron las siguientes ufc/cm<sup>2</sup>: bacterias lácticas,  $2 \times 10^6$ ; mesófilos aerobios,  $7 \times 10^5$ ; enterobacterias,  $< 2 \times 10^2$ ; levaduras,  $1.6 \times 10^4$  y mohos  $< 10^2$ . A pesar de esto, las cuentas microbianas de las bolas de pozol preparadas sobre esta mesa de madera mostraron pocas diferencias con respecto a las que se prepararon sobre el plástico limpio (Tabla 5.3; pozol 1 *versus* pozol 2 y pozol 3 *versus* pozol 4).

El hecho de que no se hayan detectado enterobacterias en el pozol molido en el molino de mano y preparado sobre la mesa de madera (Tabla 5.3; pozol 3) indica que la mesa no fue una fuente importante de este tipo de bacterias.

**Tabla 5.2** Concentraciones de microorganismos presentes en diferentes etapas durante la producción de pozol por un procedimiento modificado con una cocción adicional de los granos de nixtamal después del remojo

Etapa de procesamiento	Concentración microbiana (log <sub>10</sub> ufc/g de peso húmedo)				
	Bacterias lácticas	Bacterias mesófilas aerobias	Enterobacterias	Levaduras	Mohos
1. Granos de maíz hervidos con cal, descascarados, después del remojo.	3.0	4.5	1.6	<2.0	<2.0
2. Granos hervidos después de ser remojados	<1.0	<2.0	<1.0	<2.0	<2.0
3. Molienda.	5.9	5.3	3.2	3.9	2.5
4. Bola de pozol incubada durante 6 h.	6.6	5.2	3.9	2.7	<1.0
5. Bola de pozol incubada durante 14 h.	8.6	5.4	5.9	4.4	<2.0
6. Bola de pozol incubada durante 30 h.	8.8	6.9	6.0	5.4	2.7

**Tabla 5.3** Números de microorganismos en bolas de pozol elaboradas por diferentes métodos

Pozol Núm.	Proceso*					Concentración microbiana (log <sub>10</sub> ufc/g de peso húmedo)**					
	Segunda cocción	Molienda		Bolas de pozol hechas:			Bacterias lácticas	Bacterias mesófilas no lácticas	Enterobacte- rias	Levaduras	Mohos
		Molino comercial	Molino esterilen el laboratorio	En la casa, sobre:		En el laborato- rio sobre el plástico					
				Mesa	Plástico						
Estándar		+		+			6.6	5.2	3.9	2.7	<2.0
1.	+	+		+			6.3	5.1	3.5	3.6	2.0
2.	+	+			+		6.1	5.4	3.2	3.4	1.7
3.	+		+	+			3.9	3.5	<1.0	2.4	<2.0
4.	+		+		+		3.2	3.2	<1.0	<2.0	<2.0
5.	+		+			+	<1.0	<2.0	<1.0	<2.0	<2.0

\* Se hirvieron los granos de maíz seco en agua con cal, se descascararon, se lavaron en agua de la llave, se remojaron durante la noche a temperatura ambiente y luego se trataron como se indica. Para mayores detalles, ver Figura 5.1. El pozol estándar es el proceso tradicional.

\*\* El pozol estándar y los pozoles 1 a 4 se incubaron a 28°C durante 6 h después de la molienda antes del análisis, mientras que el pozol 5 se incubó 0.5 h.

### **5.3.5 Efecto de la microbiota del aire**

El pozol 4 se preparó en la casa del productor, usando el molino manual y las bolas se formaron sobre el plástico, mientras que el pozol 5 se hizo de la misma manera, pero en el laboratorio. El pozol 4 recibió suficiente inóculo como para asegurar su fermentación; sin embargo los números iniciales de microorganismos fueron mucho menores que los de lotes de pozol de masas molidas en el molino comercial (Tabla 5.3). Por esto, en las bolas del pozol 4 no se llevó a cabo una fermentación tan consistente como en las de otros lotes contaminados con mayores dosis. La mayoría de las bolas de pozol preparadas en el laboratorio (pozol 5) no fermentaron (Figura 5.10). Estas observaciones sugieren que el aire de la casa contribuyó con algunos microorganismos, pero sus números no fueron suficientes para asegurar una fermentación rápida y consistente.

### **5.3.6 Crecimiento durante la incubación**

Se hizo un seguimiento de la fermentación de los diferentes tipos de pozol midiendo los cambios de pH en las masas con el tiempo (Figura 5.10). Es evidente que el proceso tradicional provee tanto los mayores números iniciales de microorganismos (Tabla 5.3) como la fermentación más rápida. Las bolas de pozol preparadas con los granos de nixtamal hervidos después del remojo y molidos en el molino comercial fermentaron prácticamente con la misma rapidez que el tradicional, pero los que se molieron en el molino estéril fermentaron más lentamente. La masa de pozol preparada en forma aséptica (pozol 5) no fermentó, a excepción de una de las bolas, que se analizó a las 75 horas de incubación.

## **5.4 DISCUSIÓN**

### **5.4.1 Fuentes de microorganismos en el pozol**

El remojo del nixtamal durante la noche permitió el crecimiento de una diversidad de tipos de bacterias, incluyendo las lácticas, mesófilas aerobias y enterobacterias, que constituyeron la microbiota primaria del pozol. La molienda en un molino comercial inoculó la masa con números altos de bacterias lácticas, bacterias mesófilas aerobias y añadió levaduras.

Cuando se eliminó la microbiota del remojo al hervir los granos, la molienda de éstos en el molino comercial resultó en la incorporación de una microbiota de bacterias lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias y levaduras. La cuenta de levaduras fue menor de  $10^2$  ufc/g en los granos remojados, pero de  $8 \times 10^2$  a  $7.4 \times 10^3$  ufc/g en la masa después de moler en el molino comercial. Esto sugiere que las levaduras no crecieron en el agua de remojo, sino que se incorporaron del molino. Evidentemente, la masa retenida en los espacios muertos del molino sirvió como una fuente potente de inóculo de bacterias lácticas y de contaminantes indeseables para lotes frescos de masa.

Otras etapas de procesamiento, incluyendo el contacto con la mesa de madera, la manipulación de la masa y la exposición al aire de la casa no fueron fuentes relevantes de inóculo, comparados con las dos etapas principales: el remojo y la molienda.

### **5.4.2 Preparación del pozol de calidad microbiológica aceptable**

El pozol estándar preparado en este experimento, como la masa para tortillas estudiada por Capparelli y Mata (1975), contenía enterobacterias y otras bacterias mesófilas aerobias, cuyos números altos no parecieron ser afectados por la acidez y valores bajos de pH desarrollados durante la fermentación. Para pretender obtener pozol con números bajos de bacterias contaminantes es necesario evitar la contaminación inicial o promover la producción de metabolitos más inhibitorios durante la fermentación (Nuraida y col.,

1992), o eliminar los contaminantes por tratamientos posteriores. Se pudo eliminar la microbiota calentando hasta ebullición los granos después del remojo, como hacen los productores mestizos (aunque sin prolongar la cocción hasta el reventado del grano), y usando un molino limpio para minimizar la re-contaminación. Para esto sería necesario mejorar el diseño del molino, para disminuir el espacio muerto en donde se pueda acumular la masa y que sea más fácil de limpiar. Se requeriría también poner más atención en la higiene en todos los pasos.

Las técnicas para reducir la contaminación por microorganismos indeseables reducirían al mismo tiempo los números de bacterias lácticas necesarias para la fermentación. Debido a esto, la introducción de métodos de producción más higiénicos necesitaría acompañarse de la inoculación deliberada de la masa con bacterias lácticas seleccionadas, ya sea como la masa de un lote previo de pozol, o como un cultivo iniciado r definido.

## 5.5 CONCLUSIONES

Se determinó el momento de inoculación tanto de bacterias lácticas (esenciales para este proceso), como de contaminantes indeseables en esta fermentación natural. Los resultados de este estudio son importantes para el diseño de estrategias para mejorar la calidad sanitaria del pozol:

1. La etapa donde ocurrió la mayor inoculación fue la molienda.
2. La masa retenida en los espacios muertos del molino constituyó una potente fuente de inóculo de bacterias lácticas y de microorganismos indeseables (vg. enterobacterias y mesófilos aerobios). Sería importante modificar el diseño del molino, de manera que fuera más fácil de limpiar.



**3. Se puede eliminar la contaminación por microorganismos indeseables hirviendo los granos después del remojo, usando un molino limpio y practicando medidas de higiene en cada paso.**

## Capítulo 6

# MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN EN POZOLES TRADICIONALES

### 6.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran en la naturaleza formando cultivos mixtos, por lo que es de esperarse que éstos existan en los alimentos fermentados muy antiguos que ocurren de manera espontánea (vs. inoculados).

El inóculo del pozol consiste de una mezcla de varios grupos microbianos (bacterias, mohos, levaduras), y su sustrato, la masa de nixtamal, contiene diversos componentes (carbohidratos, proteínas, lípidos, sales, etc.) en forma de una matriz heterogénea, que incluye partes de material cocido y partes parcialmente cocidas, de diferente tamaño de partícula y muy seguramente con diferente grado de aireación en la superficie de la masa que con respecto al interior, por lo que se espera que su fermentación espontánea sea un proceso muy complejo.

Es necesario conocer los eventos ecológicos que ocurren durante la fermentación, con el fin de favorecer la actividad de los microorganismos que producen los cambios deseables y suprimir el crecimiento de los patógenos y de los que causan la descomposición del sustrato. El control de esta fermentación compleja permitiría asegurar la obtención de productos de calidad constante.

Se plantearon entonces como objetivos de esta sección determinar en qué medida y con qué selectividad los grupos microbianos que se encuentran en la masa recién preparada se propagan y arraigan durante su fermentación. Para ésto, se buscó determinar:

1. Si existen diferencias en el desarrollo de los microorganismos entre el interior y la superficie de la masa.

2. Si existe algún paralelismo en el desarrollo de microorganismos entre los pozoles indígena y mestizo.
3. Si se inhibe durante la fermentación el crecimiento de microorganismos indeseables (enterobacterias y mesófilos no lácticos).

## **6.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1 Diseño experimental**

Se estudió el desarrollo de microorganismos durante la fermentación del pozol en masas elaboradas por dos productores de San Cristóbal de las Casas, uno indígena y otro mestizo. Los productores fueron los mismos con los que se llevó a cabo el estudio sobre la microbiología de las masas (Sección 4.2), por lo que los procesos de elaboración son los de la Figura 4.5.

### **6.2.2 Muestreo**

Se recolectaron bolas de nixtamal recién preparadas por cada productor, se colocaron en bolsas de plástico nuevas y se llevaron al laboratorio, donde se envolvieron en hojas de plátano que habían sido pasadas por la flama para hacerlas flexibles y se incubaron a 28°C.

A cada tiempo de fermentación (3, 6, 9, 12, 24 horas y 9 días) se examinó una bola de masa por el método de sacrificio de muestras. Se realizó un experimento separado en el que se recolectaron y prepararon de la misma manera masas indígena y mestiza, pero se incubaron a temperatura ambiente durante el invierno (18-20°C) y se sacrificó una bola cada 24 horas para medir su pH. Se tomaron muestras de la superficie de la bola, hasta una profundidad máxima de 2 mm, con una espátula estéril. Para obtener las muestras del interior se partieron las bolas a la mitad y se tomó material del centro con una espátula estéril.

### **6.2.3 Determinación de poblaciones microbianas**

Se añadieron 10 g de masa (peso húmedo) a 90 ml de peptona (Bioxon 154-3) al 0.1% y se agitaron en un matraz estéril cubierto con torunda de algodón durante 1 minuto a 2000 rpm en agitador magnético (Thermolyne tipo 1000), con magneto previamente flameado y enfriado. Las diluciones subsecuentes se realizaron con peptona al 0.1%. Se determinaron las cuentas viables de bacterias lácticas, mesófilos no lácticos, enterobacterias, mohos y levaduras, de acuerdo con los procedimientos señalados en Materiales y Métodos Generales.

### **6.2.4 Determinaciones de pH y humedad**

Se realizaron de acuerdo con los procedimientos señalados en Materiales y Métodos Generales.

## **6.3 RESULTADOS**

### **6.3.1 Dinámica de crecimiento microbiano**

Bacterias lácticas. Se puede observar que tanto en el pozol indígena (Figura 6.1A) como en el mestizo (Figura 6.1B) se desarrollaron las bacterias lácticas, alcanzando sus cuentas máximas (en el intervalo  $10^8$ - $10^9$  ufc/g en todos los casos) a las 9 horas de fermentación, después de lo cual se mantuvieron constantes hasta las 48 horas, y a los 9 días las cuentas no habían disminuido. No existieron diferencias en las cuentas entre los pozoles indígena y mestizo ni entre el interior y la superficie de las masas.

Bacterias mesófilas no lácticas Estas bacterias crecieron en forma paralela a las bacterias lácticas en ambas masas, alcanzando su máximo desarrollo a las 12 horas de fermentación aproximadamente, con cuentas de  $10^7$ -  $10^9$  ufc/g para ambos grupos, y sus números se mantuvieron constantes hasta las 48 horas de fermentación. No se observaron diferencias

notables en las máximas cuentas alcanzadas por estos microorganismos entre los pozoles indígena y mestizo, ni entre la superficie y el interior del pozol indígena; sin embargo la velocidad de crecimiento fue mayor en el pozol mestizo y los números en la superficie del pozol mestizo también fueron mayores que en el interior. A los 9 días de fermentación las cuentas en el interior de las bolas permanecían sin cambio, mientras que en la superficie se habían reducido hasta aproximadamente  $10^5$  ufc/g.

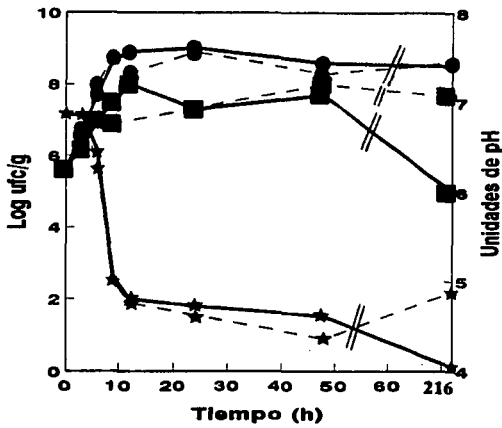
**Enterobacterias.** Las enterobacterias (Figura 6.2) crecieron tanto en la superficie como en el interior de las masas mestizas e indígenas durante las primeras 9 horas de fermentación, junto con el resto de las bacterias, alcanzando cuentas entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g. Éstas se mantuvieron hasta las 48 horas de fermentación, cuando el pH de las masas había alcanzado valores inferiores a 4.5 (Figura 6.2). A los 9 días de fermentación las cuentas de las masas indígenas se habían reducido a aproximadamente 10 ufc/g, mientras que la de la masa mestiza se redujo únicamente a  $10^4$  ufc/g.

**Mohos y levaduras** En la Tabla 6.1 se presentan las cuentas interiores y superficiales de propágulos de mohos y levaduras de los pozoles mestizo e indígena a las 0 y 48 horas de fermentación. En todos los casos se observó un desarrollo de ambos grupos microbianos, siendo notablemente mayor en la superficie que en el interior de las bolas de masa.

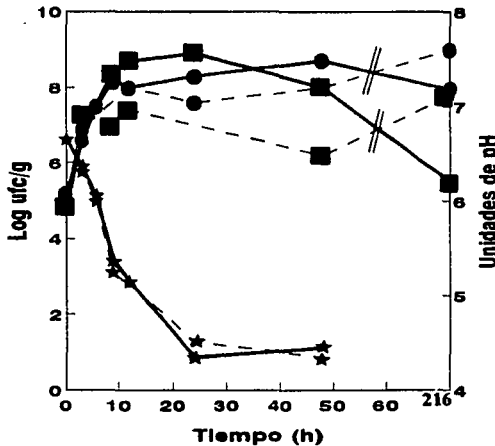
### **6.3.2 Cambios en el pH de las masas**

Los cambios de pH de las masas indígena y mestiza incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  se muestran en la Figura 6.3. En la masa indígena el pH no varió en las primeras 3 horas de fermentación, seguido de un descenso rápido, para alcanzar valores de 4.7-4.8 a las 12 horas y de 4.3-4.6 a las 24 horas. El pH del pozol mestizo disminuyó desde el inicio de la fermentación,

### A: Método indígena



### B: Método mestizo



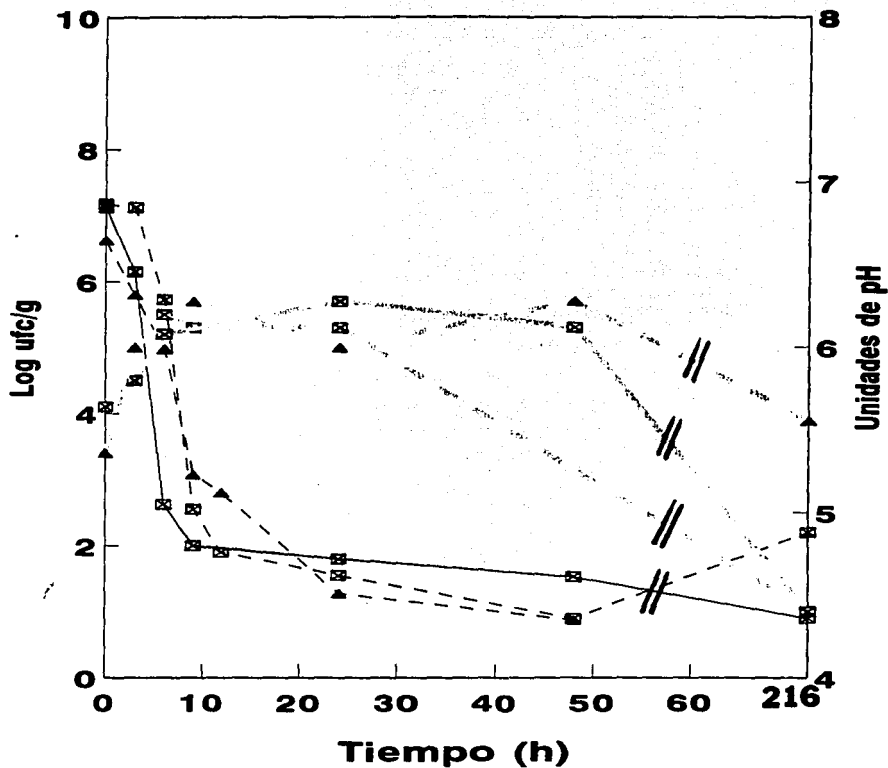
**Figura 6.1** Fermentación de masas preparadas por el método indígena (A) y por el método mestizo (B) e incubadas a 28°C. Crecimiento de bacterias lácticas (●) y de bacterias mesófilas no lácticas (■) y valores de pH (★) en la superficie (—) y en el interior (---) de las masas. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de 10 muestras para el tiempo cero, 3 muestras a las 48 y 216 h y una en el resto.

pero más lentamente que el indígena, siendo de 5.1 a las 12 horas de fermentación y de 4.3-4.4 a las 48 horas.

Los cambios de pH de las masas incubadas a temperatura ambiente durante el invierno (18-20°C) fueron mucho más lentos que a 28°C (Figura 6.4). El indígena tardó 3 días en llegar a 4.5 y el valor del mestizo era ligeramente inferior a 5 después de 10 días de fermentación. El pH de la masa indígena fue inferior al de la mestiza durante toda la fermentación.

### **6.3.3 Contenido de humedad inicial y apariencia de las masas**

La masa indígena recién moldeada tenía un  $52 \pm 3.3$  % de humedad y la mestiza  $72 \pm 0.6$ %. La indígena era más seca, menos homogénea, con algunos fragmentos pequeños de grano semicocido o crudo; la apariencia de la mestiza era más húmeda, más brillante que la indígena, más homogénea, con menos fragmentos de grano semicocido, o los fragmentos se integraban más a la masa.

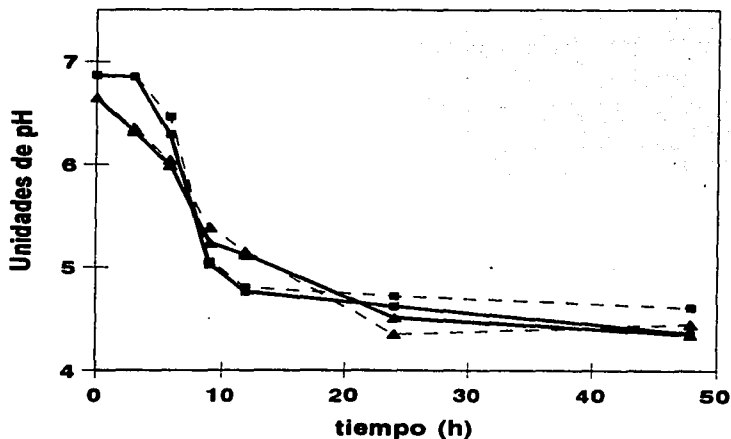


**Figura 6.2** Fermentación de masas preparadas por el método indígena (☒) y por el método mestizo (▲) e incubadas a 28°C. Crecimiento de enterobacterias (líneas gruesas) y pH (líneas delgadas) en la superficie (—) y en el interior (---) de las masas. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de 10 muestras para el tiempo cero, 3 muestras a las 48 y 216 h y una en el resto.

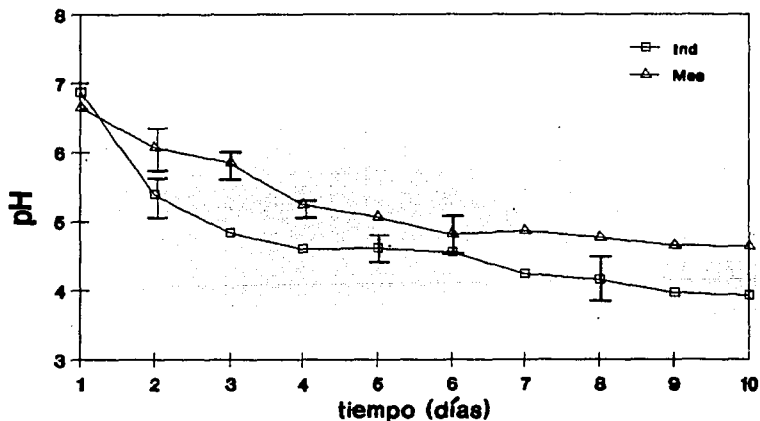


**Tabla 6.1** Cuentas de mohos y de levaduras en el interior y en la superficie de pozoles mestizos e indígenas a las 0, 48 y 216 horas de fermentación a 28°C. Los valores presentados son el promedio de duplicados del análisis de 10 muestras para el tiempo cero, 3 muestras a las 48 y 216 h, y una en el resto

Tiempo de fermentación (h)	POZOL INDÍGENA				POZOL MESTIZO			
	LEVADURAS log ufc/g		MOHOS log ufc/g		LEVADURAS log ufc/g		MOHOS log ufc/g	
	interior	superficie	interior	superficie	interior	superficie	interior	superficie
0	4.0	4.0	2.7	2.7	4.3	4.3	2.7	2.7
48	4.9	7.0	4.3	5.9	4.5	7.7	3.0	5.3
216	4.0	7.2	2.5	5.7	5.0	7.3	3.0	5.8



**Figura 6.3** Fermentación de masas preparadas por el procedimiento indígena (■) y por el procedimiento mestizo (▲), incubadas a 28°C. Valores de pH de la superficie (—) y del interior (---) de las masas. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de 10 muestras para el tiempo cero, 3 muestras a las 48 y 216 h y una en el resto.



**Figura 6.4** Valores de pH del interior de masas preparadas con el método indígena (□) y por el método mestizo (Δ), incubadas a temperatura ambiente de invierno (18-20°C). Se analizaron tres muestras en cada tiempo. Los valores graficados son el promedio y las líneas verticales la desviación estándar.

## 6.4 DISCUSIÓN

### 6.4.1 Cambios en las poblaciones microbianas

La mayoría de las fermentaciones lácticas naturales inician con una microbiota muy variada, que incluye números muy pequeños de bacterias lácticas, las cuales después de un tiempo de fermentación predominan sobre todas las demás, siendo en muchas ocasiones las únicas presentes en el alimento fermentado final. La fermentación del pozol inicia con una microbiota mixta y durante las primeras 12 horas crecen todas las bacterias presentes en la masa (Figuras 6.1 y 6.2). Las bacterias lácticas inician con números muy grandes (entre  $1.6 \times 10^5$  y  $4 \times 10^5$  ufc/g) y semejantes a los de las bacterias no lácticas (entre  $7.6 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  ufc/g); sin embargo, después de 48 horas de fermentación, cuando se alcanza el valor mínimo de pH de la masa, los números de estos dos grupos microbianos siguen siendo similares (aproximadamente  $10^8$  ufc/g de bacterias lácticas y entre  $1.6 \times 10^6$  y  $10^8$  ufc/g de bacterias mesófilas no lácticas). Aún después de 9 días de fermentación las cuentas de mesófilos aerobios en la superficie de la masa se mantenían constantes, y las del interior, aunque se habían reducido entre 2 y 3 ciclos logarítmicos, todavía eran considerables (entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g).

En otros alimentos fermentados, donde los números iniciales de bacterias lácticas son iguales o menores a los del pozol, estas bacterias predominan sobre las demás (Onyekwere y col., 1989; Ofuya y Nnajifor, 1989; Okafor y col., 1984; Christian y Nyako, 1983; Ramakrishnan y col., 1983; Sánchez y col., 1983; Gashe, 1985; Wood, 1983). En general, el crecimiento de bacterias lácticas en el pozol es semejante o más rápido que en otros alimentos similares; sin embargo éstas no tienden a predominar, ya que los otros grupos bacterianos (mesófilos no lácticos y enterobacterias) no desaparecen ni aun después de 9 días de fermentación.

El *kenkey* es probablemente el alimento más parecido al pozol; sin embargo se distingue por incluir una etapa de remojo del maíz durante la cual pueden actuar las enzimas amilolíticas del grano, produciendo azúcares fermentables. Los granos remojados se

muelen y se fermenta la pasta, de manera que no se incluye una etapa de cocción antes de la fermentación que pudiera destruir estas enzimas. El primer tratamiento de los granos de pozol, en cambio, es la cocción en agua con cal, que debería ser lo suficientemente drástico como para destruir las enzimas del grano y durante el cual, además, se pierde materia seca por lixiviación que debe incluir parte de los azúcares del grano. De esta manera se esperaría que las bacterias lácticas contaran en el *kenkey* con una mayor concentración de azúcares para crecer. El crecimiento de estas bacterias fue más rápido en el pozol que el que se ha reportado para el *kenkey* (Christian y Nyako, 1983), lo cual sugiere que podrían estar actuando las bacterias amilolíticas, ya que en el nixtamal, por ser cocido, el almidón debe ser más disponible que en el maíz remojado. La comparación en el desarrollo microbiano entre el pozol y otros alimentos similares pone de manifiesto la complejidad de las fermentaciones mixtas así como la necesidad de estudiar los factores que afectan la dinámica poblacional de cada grupo.

#### **6.4.2 Diferencias en el desarrollo microbiano entre las masas mestiza e indígena.**

Las diferencias en el contenido de humedad y en apariencia de los dos tipos de masa recién preparadas, así como las diferencias en algunas características sensoriales detectadas en masas más húmedas de pozoles recolectados en diferentes mercados, reportadas en el Capítulo 4 (Tabla 4.1), sugerían que la fermentación en ambas podía ser diferente. No se detectaron, sin embargo, grandes diferencias en el crecimiento microbiano entre ambas (Figuras 6.1, 6.2 y Tabla 6.1).

Durante la nixtamalización del maíz se han reportado pérdidas de entre 5 y 14% de su materia seca en las etapas de cocción, remojo y lavado (Pfulgfelder y col., 1988). González de Palacios (en Pfulgfelder y col., 1988) reporta que las pérdidas incluyen 6.5% de proteína y 10.6% del almidón del maíz. Es de esperarse que existan también pérdidas en los azúcares solubles del grano, que constituirían la fuente de carbono directamente disponible para el crecimiento de las bacterias lácticas. Estos azúcares se encuentran en el

maíz en concentraciones muy bajas (aproximadamente 2% del peso seco del grano, incluyendo principalmente sacarosa, glucosa y fructosa) (Boyer y Shannon, 1987), y deben disminuir durante la nixtamalización. Si el proceso mestizo incluye una etapa adicional de cocción, la concentración de estos azúcares en este tipo de masas debería ser aún menor, por lo que el crecimiento de las bacterias lácticas debería verse restringido. Sin embargo, en los dos tipos de masa los siguientes grupos se desarrollaron siguiendo aproximadamente el mismo patrón, y las bacterias lácticas, las mesófilas no lácticas, las enterobacterias, los mohos y las levaduras alcanzaron aproximadamente las mismas cuentas.

De estos resultados se infiere que: 1) La concentración de azúcares simples no es un factor limitante para el crecimiento microbiano, a pesar de las pérdidas sufridas durante el proceso de nixtamalización, o 2) Las bacterias lácticas utilizan otro componente de la masa, como el almidón, o 3) Algún otro miembro de la microbiota hidroliza el almidón, produciendo la glucosa necesaria para que las bacterias lácticas se desarrollen. Este grupo podría ser el de las bacterias del género *Bacillus*, que muy comúnmente son amilolíticas, o alguno de los mohos presentes en la masa. La única diferencia apreciable en el crecimiento microbiano entre de los dos tipos de masa fue la mayor velocidad de crecimiento de las bacterias mesófilas no lácticas en la masa mestiza, donde además alcanzaron mayores cuentas. Si estas bacterias están utilizando el almidón, su crecimiento se facilitaría en este sustrato, donde, debido al tratamiento térmico adicional, debe tener mayor grado de gelatinización y por lo tanto debe ser más susceptible al ataque microbiano.

#### **6.4.3 Diferencias en el desarrollo microbiano entre el interior y la superficie de las masas.**

La masa de nixtamal se fermentó de la manera tradicional, en forma de bolas envueltas en hojas de plátano, y éstas deben permitir la difusión del aire, por lo que debe existir mayor

oxigenación en la superficie que en el centro de las bolas. No se observaron diferencias en el crecimiento de enterobacterias ni de bacterias lácticas entre el interior y la superficie de las masas. Las primeras son anaerobias facultativas, por lo que podrían desarrollarse en ambas condiciones, y las segundas son microaerófilas. Las bacterias lácticas no han desarrollado las defensas enzimáticas que permiten a los microorganismos aeróbicos crecer en presencia de las formas tóxicas de oxígeno. Al parecer, la mayoría de estas bacterias no contienen superóxido dismutasa, capaz de catalizar la conversión del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en agua oxigenada (Archivald y Fridovich, 1981; Daeschel y col., 1987). No obstante, estas bacterias han desarrollado mecanismos alternativos para deshacerse de este anión tóxico, que generalmente se produce en cultivos aeróbicos, como la acumulación intracelular de Mn(II). Esto se ha observado especialmente en bacterias asociadas con material vegetal, cuyo contenido de manganeso es mucho mayor que el de productos lácteos o cárnicos (Daeschel y col., 1987). Por otra parte, las bacterias lácticas tienen en común la característica de ser incapaces de sintetizar el grupo hemo. Sin embargo, han desarrollado NADH peroxidasas del tipo flavoproteínas, y según Condon (1987), quien observa que existen pocas evidencias de acumulación de anión superóxido durante el crecimiento de bacterias lácticas en condiciones aeróbicas ordinarias, estas catalasas son las que evitan la inhibición de las bacterias lácticas en cultivos con aireación. De esta manera, las bacterias lácticas son aerotolerantes y se explica que hayan crecido por igual en la superficie y en el interior de las bolas de masa. Sin embargo, si la oxigenación es mayor en la superficie, se espera que su comportamiento difiera en ambos ambientes. En cultivos aireados se produce más ATP y varían los productos finales del metabolismo de azúcares, así como la variedad de sustratos que pueden ser metabolizados (Condon, 1987). De hecho, durante la caracterización de las bacterias lácticas aisladas en este estudio (Capítulo 4, Tabla 4.2) y en el de Nuraida (1988) se observó que algunas cepas eran capaces de hidrolizar el almidón en condiciones anaeróbicas pero no en

presencia de aire. Por otra parte, la producción de compuestos de sabor, como el diacetilo, también depende de la concentración de oxígeno (Bassit y col., 1993).

La aireación, en cambio, sí promovió el crecimiento de microorganismos más afines a un ambiente aerobio. En el caso de los microorganismos mesófilos aerobios, se observó una tendencia de mayor crecimiento en la superficie que en el centro de las masas y en el de los mohos y levaduras el crecimiento fue significativamente mayor en la superficie.

#### **6.4.4 Cambios de pH durante la fermentación**

Ambas masas se acidificaron, alcanzando valores bajos a las 12 horas de fermentación. El retraso inicial en el descenso de pH de la masa indígena puede deberse a la acción del hidróxido de calcio remanente en la masa después de la nixtamalización. Como la masa mestiza sufre una etapa adicional de cocción en agua, la remoción de hidróxido de calcio debe ser mayor. Esta podría ser la razón por la cual el valor de pH disminuye desde el principio de la fermentación. Después de las primeras 3 horas, el pH desciende más rápidamente en las masas indígenas que en las mestizas, probablemente como consecuencia de la mayor disponibilidad de azúcares fermentables en las primeras. Cuando la fermentación se llevó a cabo a una temperatura más baja, esta diferencia fue más notable, descendiendo más lentamente el pH de las masas mestizas, con valores mayores (0.5 unidades de pH) que las indígenas durante toda la fermentación.

En alimentos fermentados similares se obtienen aproximadamente los mismos valores de pH que se observaron en las masas de nixtamal a las 12 y 24 horas de fermentación (Banigo y col., 1983; Christian y Nyako, 1983; Gatumbi y col., 1983; Onyekwere y col., 1989); sin embargo si se prolonga este tiempo, a diferencia del pozol, es común alcanzar valores menores. El pH del *ogi* de Nigeria puede disminuir hasta 3.5, pero la acidez correspondiente a éste ya no es aceptable, por lo que el pH mínimo debe ser de aproximadamente 3.7 (Banigo y col., 1983). En el caso del *gari* de Nigeria, en cambio, se obtiene el sabor deseado con un pH de 4 (Ogunsua y col., 1983). En el caso del pozol no

se obtuvieron valores menores de 4 después de un tiempo prolongado, probablemente debido a la neutralización de una parte de los ácidos producida por el hidróxido de calcio remanente en la masa.

Holzapfel (1989) menciona que uno de los problemas de la industrialización del maíz para producir *mageu* utilizando cultivos termófilos de bacterias lácticas reside en la baja capacidad buffer del sustrato, el pH baja rápidamente, resultando en la inhibición de las actividades microbianas. Debido a esto, para su industrialización, se añaden fosfatos que funcionan como amortiguadores. Se obtiene en 24 horas un pH final de 3.5-3.7, menor que el del pozol, probablemente porque antes de la fermentación se añaden al sustrato azúcares (2-3%). Por otra parte, la fermentación del *puto* filipino es un ejemplo de un caso raro en el que se añade una sustancia química para controlar el pH en la fermentación tradicional. Se fermenta una pasta de arroz previamente remojado y molido y posteriormente se le añade hidróxido de sodio y sacarosa, para proceder a la segunda etapa de fermentación, después de la cual se cuece al vapor para obtener un pan. La adición del álcali neutraliza parte del ácido producido y de esta manera la fermentación puede continuar (Sánchez y col., 1983).

No se observaron grandes diferencias entre los valores de pH del interior y de la superficie de las masas en este experimento; sin embargo cuando se recolectaron muestras en diferentes zonas del estado de Chiapas, sí se observó que el pH de la superficie tendía a ser mayor que el del interior (Tabla 4.1). Esto mismo se reporta para la fermentación del *kenkey*, que se lleva a cabo, como en el caso del pozol, en forma de bolas envueltas en hojas de plátano o de maíz. El pH del interior de las masas disminuye de 6.4-6.8 a 3.5-4.1, mientras que el de su superficie baja de 7.0 a 4.5 en dos días, y posteriormente aumenta (Christian y Nyako, 1983). Si las condiciones existentes en la superficie de las masas de pozol favorecen el crecimiento de mohos y levaduras, es probable que estos consuman los ácidos presentes en esas zonas aumentando el valor del pH. Este efecto es



más marcado en el *kenkey* que en el pozol debido probablemente a la acción del hidróxido de calcio en el segundo.

#### **6.4.5 Seguridad microbiológica del pozol**

En contraste con la mayoría de los reportes en los que se observa una inhibición eficiente de microorganismos indeseables en alimentos fermentados, el grupo de las enterobacterias, que puede incluir patógenos causantes de enfermedades diarreicas, no se inhibió durante la fermentación, a pesar de que el pH de las masas disminuyó hasta valores bajos. Las bacterias lácticas ejercen actividad antimicrobiana mediante la producción de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, de bacteriocinas, de diacetilo y de peróxido de hidrógeno (Daeschel, 1989). En las masas de pozol estudiadas, a pesar de haber sido acidificadas, no se observó una inhibición de enterobacterias. Esta fermentación, a diferencia de las mencionadas anteriormente, se lleva a cabo en forma sólida. La acidificación es relativamente rápida, ya que en 12 horas se había alcanzado el valor mínimo de pH; sin embargo, seguramente la concentración de ácidos no es homogénea en toda la masa, ya que estos deben difundirse desde el lugar en el que se producen. De esta manera, las enterobacterias tendrían la posibilidad de desarrollarse en microambientes donde no se han difundido estos ácidos. Por otra parte, también es posible que algunos miembros de la microbiota, como ciertas levaduras o mohos, consuman parte de los ácidos producidos, creando también microambientes libres de ácidos o con una concentración menor de éstos. Östling y Lindgren (1993) concluyen, de hecho, que las razones de la sobrevivencia de algunas entérobacterias en ensilados son la degradación de los ácidos producidos o la heterogeneidad en la distribución de los mismos en el material en fermentación.

Pflugfelder y col. (1988) explican que la masa de nixtamal para tortillas no es una masa uniforme, con composición y propiedades físicas homogéneas, sino una mezcla compleja de fracciones de diferente tamaño y composición. Es de esperar entonces que la masa de

nixtamal que se que se usa para hacer pozol, al ser martajada y no molida finamente, sea aún más heterogénea en composición y propiedades físicas.

La neutralización ejercida por el hidróxido de calcio en las masas de nixtamal, es otra propiedad importante del sustrato que podría influir disminuyendo el efecto de la acidificación sobre las enterobacterias. McDonald y col. (1991) reportaron en un estudio sobre acidificación de pepinillos una menor inhibición de enterobacterias cuando añadían a la salmuera ácido acético con hidróxido de calcio que cuando no agregaban el último.

En el caso del pozol, si el efecto de la acidificación en la eliminación de microorganismos indeseables se ve disminuido por este fenómeno, sería de sumo interés estudiar la producción de otras sustancias antimicrobianas por las bacterias lácticas, o por otro tipo de bacterias, que jugaran un papel especialmente importante. De hecho, se ha aislado de las masas en fermentación una bacteria, identificada inicialmente como *Agrobacterium azotophilum*, que muestra antagonismo sobre diversas especies de bacterias y hongos, incluyendo algunas patógenas (Herrera y Ulloa, 1975). Cabe mencionar que se ha reportado el fenómeno de la fijación de nitrógeno en el pozol, llevada a cabo por *Agrobacterium azotophilum* (Taboada y col., 1975) y por especies de *Klebsiella* (Ulloa y col., 1983), que es una enterobacteria. El hecho de que las enterobacterias no se inhiban durante la fermentación podría ser uno de los factores que favorezcan la ocurrencia de este fenómeno, que no se había reportado en ningún alimento fermentado.

La higiene durante el proceso de elaboración de la masa es entonces también esencial, como se discutió en el Capítulo 5. Se demostró que era posible obtener masas libres de microorganismos indeseables, aunque fuera necesaria la adición de bacterias lácticas.

Otra alternativa consiste en realizar un proceso como el descrito por Nout (1989b), que propone el desarrollo de ciclos de fermentación. Al principio de cada ciclo se inocula material fermentado del lote anterior, y de esta manera se lleva a cabo una selección gradual natural de bacterias lácticas.

## 6.5 CONCLUSIONES

Se determinó el desarrollo de los diferentes grupos microbianos presentes en las masas elaboradas por productores regionales, distinguiendo los efectos del grado de aireación y del tipo de proceso empleado para producir la masa (mestizo o indígena), en el crecimiento microbiano:

1. Todos los grupos microbianos presentes en las masas recién preparadas (bacterias lácticas, bacterias no lácticas, enterobacterias, mohos y levaduras) crecen en la masa. Las bacterias lácticas y las mesófilas no lácticas crecen más rápidamente que los demás grupos, pero no se observó una predominancia de las bacterias lácticas.
2. No existen diferencias de crecimiento entre el interior y la superficie de la masa en el caso de las bacterias lácticas y de las enterobacterias. Las cuentas en la superficie tienden a ser mayores que las del interior para el resto de los grupos. Es posible que como consecuencia de esto las características de las diferentes zonas de la masa fermentada varíen, dependiendo del grado de aireación.
3. No existen diferencias notables entre el pH de la superficie y el del interior de las masas durante la fermentación.
4. No existen grandes diferencias entre el crecimiento de cada grupo microbiano en los pozoles mestizo e indígena, a pesar de las diferencias en sus procesos de elaboración.
5. Las masas indígenas se acidifican hasta niveles más bajos de pH que las mestizas. El patrón de crecimiento microbiano fue similar en ambas, por lo que se infiere que el metabolismo fue diferente.

**6. No se observó una inhibición de bacterias mesófilas no lácticas ni de enterobacterias como resultado de la acidificación de las masas a valores de pH menores de 4.5. El arraigo de estos grupos microbianos en las masas acidificadas va en detrimento de la calidad sanitaria del producto.**

## Capítulo 7

# MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN EN UN SISTEMA ASÉPTICO

### 7.1 INTRODUCCIÓN

La fermentación del pozol es un proceso dinámico en el que ocurren simultáneamente variaciones en las diferentes poblaciones microbianas y como resultado de éstas se producen cambios graduales en las masas. La mayoría de los alimentos fermentados tradicionales resultan de fermentaciones naturales realizadas en condiciones no estériles, lo cual constituye una ventaja, ya que pueden producirse en condiciones rurales. El tipo de sustrato y las condiciones de fermentación causan una selección gradual en los tipos de microorganismos que se desarrollan y producen las características deseadas en el alimento. Estas fermentaciones son difíciles de controlar y con frecuencia es difícil predecir su calidad. Es importante entonces buscar técnicas para controlarlas y estandarizarlas y para esto es necesario mejorar la comprensión del proceso de fermentación.

Como las características del alimento dependen de la actividad de los microorganismos, es de vital importancia comprender el papel que juega cada microorganismo en la fermentación. Además, en la mayoría de estos alimentos, la producción de sabores, aromas, texturas, acción conservadora, etc. es producto de interacciones microbianas (Steinkraus, 1989). Debido a la complejidad de los eventos que ocurren durante el crecimiento microbiano en estos procesos, los cambios que se suscitan durante el desarrollo simultáneo del cultivo mixto serían difíciles de interpretar, y es la razón por la cual se recurre al uso de fermentaciones modelo con cultivos puros. De esta manera ha sido posible elucidar cuáles son los microorganismos esenciales para algunas

fermentaciones, sus interacciones y sus secuencias metabólicas (Ofuya y Nnajiolor, 1989; Okafor y col., 1984; Holzapfel, 1989).

Siendo el pozol un alimento ácido, la acción de las bacterias lácticas es esencial. Por esta razón se seleccionaron cepas predominantes de este grupo microbiano para estudiar su papel en la fermentación. El almidón es el carbohidrato de mayor abundancia en la masa, por lo que es lógico suponer que sea fermentado por las bacterias lácticas, aunque la actividad amilolítica no es una característica común de estas bacterias. En la fermentación del pozol tendieron a predominar las cepas heterofermentativas y dentro de éstas se aislaron cepas de *Leuconostoc* capaces de hidrolizar el almidón (Tabla 4.2). Es importante estudiar el proceso de acidificación y el efecto de la acción de las bacterias lácticas en el pozol y para esto se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar si las cepas puras de estas bacterias son capaces de desarrollarse en la masa de nixtamal, o si requieren de la acción de algún otro miembro de la microbiota natural para hacerlo.
2. Determinar si existen diferencias en el crecimiento y en la modificación de la masa entre cepas homo y heterofermentativas.
3. Determinar si es esencial que las cepas de bacterias lácticas posean actividad amilolítica para crecer en la masa y acidificarla.
4. Determinar si existen diferencias en la propagación de cada cepa cuando se inoculan en cultivo puro o en cultivo mixto.
5. Determinar si el proceso de nixtamalización afecta el crecimiento de las cepas en la masa.

## 7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1 Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos utilizando un sistema modelo de la fermentación del pozol, con cepas de bacterias lácticas aisladas del mismo.

Experimento 1: Se estudió el crecimiento individual de las tres cepas puras en nixtamal estéril.

Experimento 2: Se comparó el crecimiento de las cepas puras en nixtamal estéril con el de un cultivo mixto de las tres en el mismo sustrato y el del mismo cultivo mixto en el sustrato sin esterilizar.

Experimento 3: Se estudió el crecimiento del mismo cultivo mixto en un sustrato de maíz sin nixtamalizar (*kenkey*) esterilizado y sin esterilizar.

En cada experimento se trabajó con el mismo lote de masa y el mismo lote de inóculo. Se determinaron el contenido de humedad y la actividad acuosa de cada lote de masa. En todos los casos se determinaron las cuentas viables de cada una de las cepas, de bacterias contaminantes, el pH y la acidez titulable de las masas en cada tiempo de fermentación.

### 7.2.2 Microorganismos

Se seleccionaron tres cepas de bacterias lácticas, de entre las predominantes, aisladas de pozoles de Chiapas por J.D. Owens y C. Wachter e identificadas por Nuraida (1988):

Cepa No. 1: *Leuconostoc mesenteroides* (heterofermentativa, amilasa positiva)

Cepa No. 20: *Leuconostoc* sp. (heterofermentativa, amilasa negativa)

Cepa No. 9: *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa, amilasa positiva)

Las características de cada cepa se presentan en el Apéndice 5.

### **7.2.3 Sistema de fermentación**

Preparación de la masa de nixtamal. Se pesó la cantidad requerida de masa de nixtamal comercial (Quaker Oats Co., Chicago, E.U.) en una bolsa de plástico y se le agregó la misma cantidad de agua desionizada (p/v) en pequeñas cantidades, mientras se amasaba dentro de la misma bolsa.

Preparación de la masa de kenkey. Se preparó de acuerdo con el procedimiento reportado por Christian y Nyako (1983), cuyo diagrama se muestra en la Figura 7.1. Se pesó 1 Kg de maíz y se lavó con agua de la llave. Se colocó en una cubeta de acero inoxidable, se le añadió agua destilada en cantidad suficiente para cubrir los granos (aproximadamente 3 l), se cubrió la cubeta con papel aluminio y se incubó a 30°C durante 18 horas. Se escurrió y se molió en molino de martillos (C & N Laboratory Mill), con tamaño de apertura de 2 mm. A esta harina se le agregaron 320 ml de agua destilada para obtener la masa.

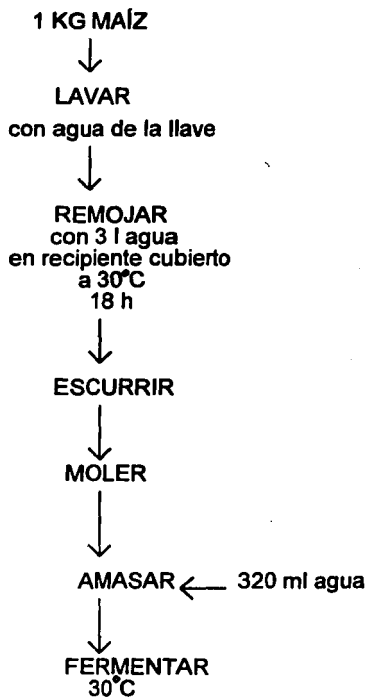
Esterilización de la masa. Debido a que la esterilización por calor modificaría sus propiedades, las masas se esterilizaron por radiación gamma en Sabre Products, Reading, Inglaterra. Se colocó la cantidad requerida de masa (300-500 g) en bolsas de plástico, se formó con la masa una torta plana y se selló la bolsa con calor, procurando retener en la bolsa el mínimo volumen de aire, para evitar en lo posible la presencia de oxígeno, con el que pudieran ocurrir reacciones de oxidación durante la irradiación. Se esterilizó con una dosis de radiación gamma de 25 Kgy.

Preparación del inóculo. Se inocularon 10 ml de caldo APT (Difco 0645-01-8) con una asada del cultivo de la bacteria láctica correspondiente y se incubó a 18 horas a 30°C. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en agua desionizada estéril. Esta suspensión contenía aproximadamente  $10^9$  ufc/ml.

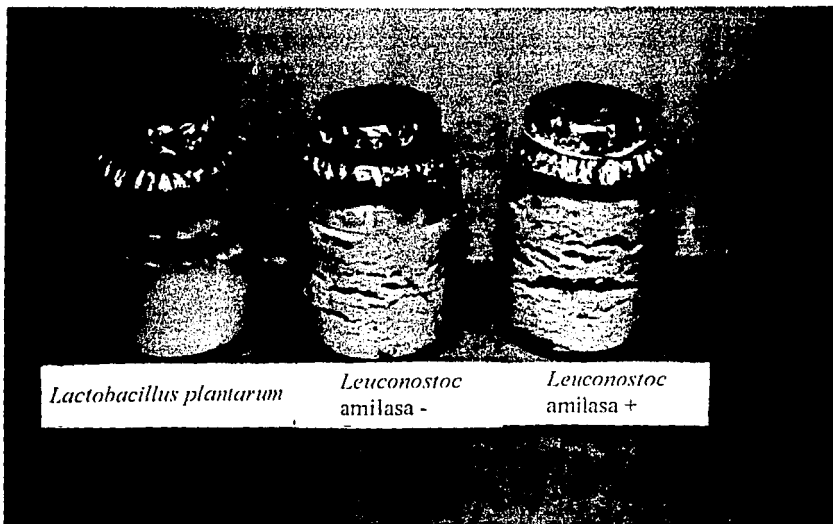


**Inoculación.** Se desinfectó la superficie de la bolsa de plástico conteniendo la masa estéril con etanol al 70% y se abrió con espátula flameada, dentro de la campana de flujo laminar. Se le añadió el volumen necesario del inóculo (recién resuspendido en agua desionizada estéril), para obtener  $10^6$  ufc por gramo de masa húmeda de cada microorganismo. Se amasó dentro de la bolsa durante 2 minutos, con movimientos que empujaban la masa de las orillas hacia el centro.

**Fermentación.** La fermentación se llevó a cabo en botellas de vidrio (Figura 7.2), las cuales se esterilizaron en autoclave, a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, con cubierta de papel aluminio sujetado con una liga. La masa inoculada se dividió en porciones iguales de aproximadamente 100 g cada una. La masa permanecía dentro de la bolsa de plástico y las divisiones se hicieron sobre la superficie de la bolsa, marcándolas con una espátula. Cada porción se transfirió con una espátula estéril a una botella; se compactó con una varilla metálica con punta plana, flameada y enfriada, de manera que no quedaran huecos visibles en la masa y ésta se cubrió con parafina líquida estéril (con la cantidad necesaria para obtener una capa de aproximadamente un centímetro sobre la masa), para asegurar condiciones homogéneas de anaerobiosis. Las botellas se cubrieron con el mismo papel aluminio y liga con que habían sido esterilizadas y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$ . Todas las manipulaciones descritas previas a la incubación se realizaron en campana de flujo laminar. En todos los casos se preparó un control manipulado de la misma manera, al que se le añadió agua desionizada estéril en vez de inóculo. En todos los casos se preparó un frasco con masa para cada tiempo de muestreo.



**Figura 7.1** Diagrama de flujo de la elaboración de masa de *kenkey*.



**Figura 7.2** Sistema de fermentación modelo del pozo. Masas inoculadas con cepas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* amilasa positiva y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa, después de 72 horas de incubación a 30°C.

#### 7.2.4 Análisis microbiológicos

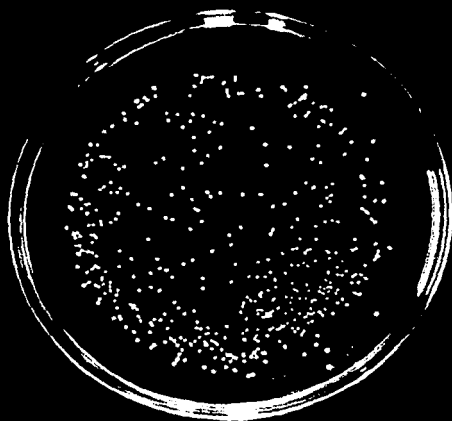
**Preparación de la muestra.** En todos los casos se tomó una muestra del centro de la masa con una espátula estéril. Se añadieron 10 g de muestra a 90 ml de peptona (Oxoid L37) al 0.1% y se homogenizaron en un stomacher (Seward Medical, Gran Bretaña) durante 1 minuto. Se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente.

**Cuenta viable de bacterias lácticas.** Se realizó una cuenta en placa, diferencial, de las bacterias inoculadas utilizando dos medios de cultivo:

**Agar de Rogosa (Oxoid CM627).** Se colocó, por duplicado, 1 ml de la dilución apropiada de la muestra en una caja Petri, se le agregó agar Rogosa y se mezcló. Las cajas con el medio solidificado se incubaron en jarra anaeróbica con una atmósfera de 95% de hidrógeno y 5% de bióxido de carbono a 30°C, durante 4 días. Se produjo la atmósfera anaerobia evacuando el aire de la jarra con una bomba de vacío y reemplazándolo con la mezcla de gases proveniente de un cilindro. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Se determinó a algunas de las colonias producidas la tinción de Gram (que debía ser positiva) y la prueba de la catalasa (que debía ser negativa), para confirmar que se tratara de bacterias lácticas. En este medio las cepas de *Leuconostoc* se diferenciaron de la de *Lactobacillus* al producir las primeras colonias de diámetro menor de 1 mm y la segunda de un diámetro aproximado de 2 mm (Figura 7.3A).

**Agar para *Leuconostoc*.** Se inocularon por duplicado 0.1 ml de diluciones apropiadas de las muestras en placas de medio para *Leuconostoc* (Garvie, 1960) (g/l: triptona (Oxoid L42), 10; extracto de levadura (Oxoid L21), 5; sacarosa, 100; solución al 1% de azida de sodio, 5 ml; agar (Oxoid L11), 15; pH 6.4- 6.6). Se incubaron a 30°C durante 1 o 2 días y se contaron las colonias grandes, translúcidas, mucoides (debido a la formación de dextrana a partir de sacarosa). En este medio no creció la cepa de *Lactobacillus* y las



AGAR ROGOSA

A



AGAR PARA *Leuconostoc*

B

**Figura 7.3** Apariencia de las colonias de las tres cepas utilizadas en: A. agar Rogosa (*L. plantarum*, colonias grandes; *Leuconostoc*, colonias chicas); B. agar para *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* amilasa positivo, colonias chicas; *Leuconostoc* sp. amilasa negativo, colonias grandes).

colonias de *Leuconostoc* se diferenciaron por tamaño, al producir la cepa 1 (amilasa positiva) colonias más pequeñas (diámetro aproximado de 2 mm) que las de la cepa 20 (amilasa negativa, diámetro aproximado de 3 mm), como se puede apreciar en la Figura 7.3B.

Cuenta viable de bacterias contaminantes. El agar nutritivo (Oxoid CM3) permite el crecimiento de una gran diversidad de bacterias. A este medio no se le añaden carbohidratos (además de los que contienen los ingredientes), por lo que los fermentadores obligados, como las bacterias lácticas, crecen muy poco y producen colonias muy pequeñas. Debido a esto, si se excluye este grupo de bacterias, que fueron las únicas que se inocularon, la cuenta en este medio se considera como microbiota contaminante. Se inocularon por duplicado placas de este medio con 0.1 ml de diluciones apropiadas de las muestras y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Se realizaron cuentas separadas de:

1. Colonias mayores de 1 mm de diámetro (bacterias contaminantes). Para confirmar que no fueran bacterias lácticas se realizó la prueba de la catalasa (la cual debía ser positiva) a una muestra representativa de ellas.
2. Colonias cuyo diámetro fuera menor o igual a 1 mm, cuya muestra representativa diera negativa la prueba de la catalasa. Se contaron estas colonias, presumiblemente de bacterias lácticas, para confirmar que su cuenta correspondiera con el mismo orden de magnitud obtenido en la cuenta total del medio de Rogosa. Ésto validó el uso de este medio para contar las bacterias no lácticas.

Cuenta viable de mohos y levaduras. Se inocularon por duplicado placas de agar extracto de malta (Oxoid CM59) con 0.1 ml de las diluciones más bajas de las masas recién esterilizadas y se incubaron a 30°C durante 5 días.

### **7.2.5 Análisis fisicoquímicos**

Contenido de humedad. Se secaron hasta peso constante charolas de aluminio de 5.5 cm de diámetro en un horno a 120°C. Se pesaron 5 g de muestra y se secaron a la misma temperatura hasta obtener peso constante. Se realizaron duplicados.

Actividad de agua. Se pesaron aproximadamente 10 g de muestra en una caja Petri de 5 cm de diámetro, la cual se colocó (sin tapa) en una cámara sellada de aproximadamente 75 x 75 x 65 mm y se midió la actividad de agua a 25°C en un medidor de actividad acuosa Protimeter modelo DP383R (Protimeter plc, Marlow, Bucks., Gran Bretaña).

pH. Se mezclaron 10 g de muestra con 20 ml de agua desionizada y se homogenizaron en un stomacher (Seward Medical, Gran Bretaña) durante un minuto. Se midió el pH de esta suspensión con un electrodo de vidrio.

Acidez titulable. Se añadieron 30 ml de agua desionizada a la suspensión en la que se midió el pH (para hacerla 10 g + 50 ml de agua). Se añadieron 3 gotas de indicador de fenolftaleína a 10 ml de la suspensión y se tituló con NaOH 0.1N hasta obtener una coloración rosada pálido. Se calculó la acidez titulable como el porcentaje de ácido láctico en la muestra húmeda.

## 7.3 RESULTADOS

### 7.3.1 Experimento 1. Crecimiento individual de las cepas puras de bacterias lácticas en nixtamal estéril.

#### Objetivos:

1. Determinar si las cepas puras de tres bacterias lácticas aisladas del pozol son capaces de desarrollarse individualmente en la masa de nixtamal en cultivo puro.
2. Determinar si existen diferencias entre el crecimiento de cepas homo y heterofermentativas en la masa y entre las modificaciones a la misma por el crecimiento de estas cepas.
3. Determinar si es esencial la capacidad amilolítica de las cepas para crecer en la masa y acidificarla.

Características de la masa. La masa esterilizada preparada para este experimento presentó un pH de 7, 58.3% de humedad y una actividad acuosa de 0.97. No se detectó la presencia de bacterias lácticas, bacterias contaminantes, mohos ni levaduras.

Crecimiento microbiano. En la Figura 7.4 se presentan las cuentas viables de *Leuconostoc mesenteroides* amilasa positiva, *Leuconostoc* sp. amilasa negativa y *Lactobacillus plantarum* amilasa positiva cuando crecieron individualmente en cultivo puro en la masa estéril. En el control no inoculado se detectó la presencia de una cuenta baja ( $10^2$  -  $10^3$  ufc/g) de bacterias contaminantes a las 24 y 48 horas de fermentación, seguramente como resultado del desarrollo de algunas células introducidas durante la manipulación de las masas. Éstas no se detectaron en las masas inoculadas. Cada una de las tres cepas inoculadas se desarrolló favorablemente en la masa, en ausencia de cualquier otro microorganismo, con una velocidad de crecimiento similar a la del grupo



de bacterias lácticas en las fermentaciones tradicionales (ver Figura 6.1) y alcanzando aproximadamente las mismas cuentas. Las dos cepas de *Leuconostoc* crecieron más rápidamente que la de *L. plantarum* durante las primeras horas de fermentación, y después de alcanzar sus máximos valores los números se mantuvieron constantes hasta las 78 horas, con excepción de la cepa amilasa positiva, cuyas cuentas disminuyeron.

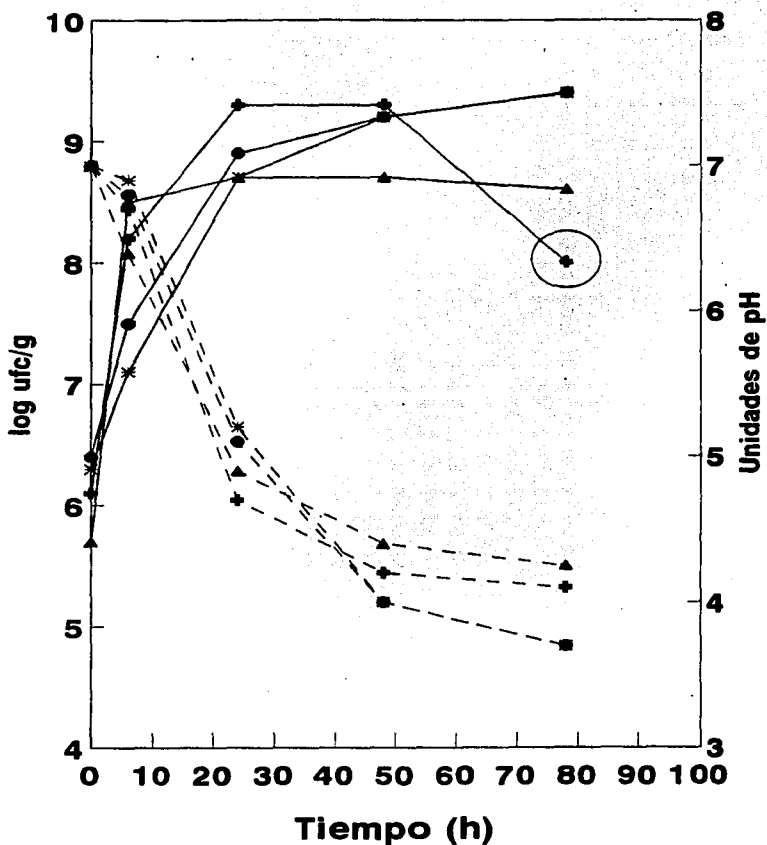
Tanto la cepa amilasa positiva como la amilasa negativa de *Leuconostoc* crecieron en la masa, pero se obtuvieron cuentas más altas de la primera que de la segunda a las 24 y 48 horas de fermentación.

#### Cambios en los valores de pH y de acidez titulable de las masas durante la fermentación.

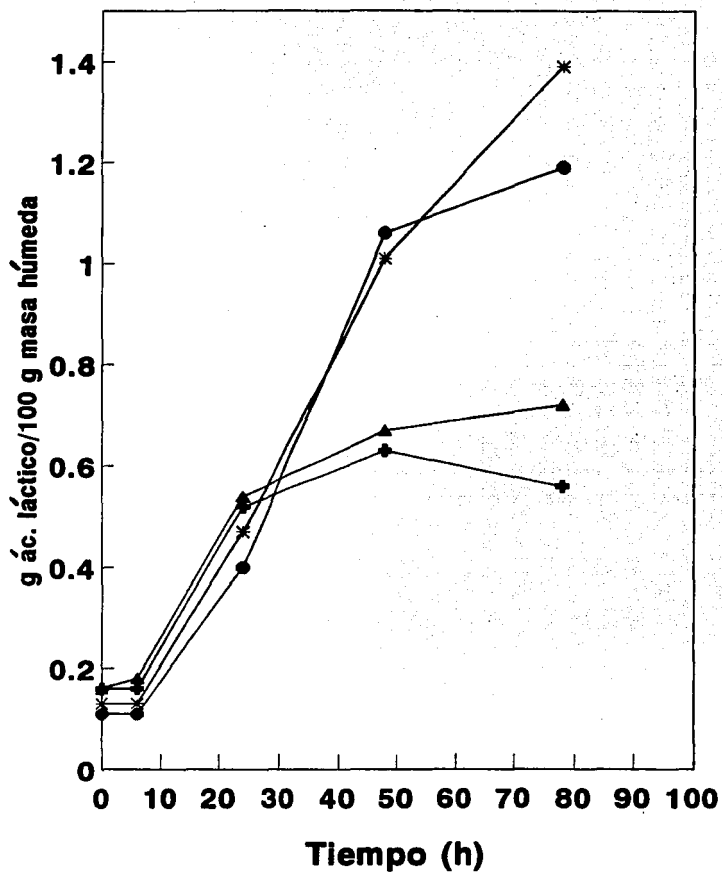
A las 24 horas de fermentación el pH de las masas inoculadas con las cepas de *Leuconostoc* era menor que el de las inoculadas con *L. plantarum*. A partir de este tiempo la disminución en el valor de pH fue mayor en el último caso, para obtener valores menores que los de *Leuconostoc* al final de la fermentación (Figura 7.4). La acidez titulable (Figura 7.5) no se modificó durante las primeras 6 horas de fermentación en ninguno de los casos y hasta las 24 horas los valores eran similares para las tres cepas inoculadas. A partir de este tiempo los valores fueron mayores para las masas inoculadas con *L. plantarum*, que es amilasa positivo, que para las inoculadas con las dos cepas de *Leuconostoc*. A pesar de que a partir de las 24 horas de fermentación no se detectaron incrementos en las cuentas de las bacterias, los valores de pH siguieron disminuyendo y los de acidez titulable aumentando. Se observaron diferencias en los cambios de pH y de acidez titulable entre las masas inoculadas con las cepas amilasa positiva y amilasa negativa de *Leuconostoc*. A las 72 horas el pH de la masa inoculada con el primero era menor y su acidez titulable también era menor, lo cual es contradictorio.

**Cambios en la apariencia de las masas.** En la Figura 7.2 se muestra la apariencia de las masas inoculadas con cada una de las cepas al final de la fermentación. Es evidente la producción de gas en las inoculadas con las cepas heterofermentativas (*Leuconostoc*), la cual se inició a las 24 horas, *versus* la ausencia de gas en la homofermentativa (*L. plantarum*). En todos los casos se distinguía un aroma frutal en las masas en fermentación.

**Reproducibilidad de las fermentaciones.** Se repitió la fermentación de la masa inoculada con *L. plantarum*, obteniéndose resultados reproducibles. Las variaciones entre ambas fermentaciones fueron: entre 1.5 y 2.5 ufc/g, en el crecimiento microbiano; entre 0.02 y 0.2 g de ácido láctico/100 g masa húmeda de acidez titulable, y entre 0 y 0.1 unidades de pH. Éstos son los errores estimados para estas series de experimentos.



**Figura 7.4** Crecimiento (líneas sólidas) de las masas inoculadas con: *L. plantarum* (\*, ●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (♣) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲) en cultivo puro, en nixtamal esterilizado, incubado a 30°C. Los puntos encerrados en un círculo indican que se obtuvieron cuentas menores al valor indicado. El valor de pH de las mismas masas se indica con líneas punteadas.



**Figura 7.5** Cambios en la acidez titulable de las masas inoculadas con: *L. plantarum* (\*, ●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (♣) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲) en cultivo puro, en nixtamal esterilizado, incubado a 30°C.

### **7.3.2 Experimento 2. Crecimiento de las cepas de bacterias lácticas en cultivo puro y mixto, en nixtamal estéril y no estéril.**

#### **Objetivos:**

1. Determinar si existen diferencias en el desarrollo de cada una de las tres cepas lácticas seleccionadas cuando se inoculan en cultivo puro o mixto.
2. Determinar si en la masa esterilizada por irradiación existe una acción inhibitoria que pudiera afectar el crecimiento de las cepas en estudio.

**Características de la masa.** La masa esterilizada preparada para este experimento presentó un pH de 7.1; 59.4% de humedad y una actividad acuosa de 0.98. No se detectó la presencia de bacterias lácticas, bacterias contaminantes, mohos ni levaduras.

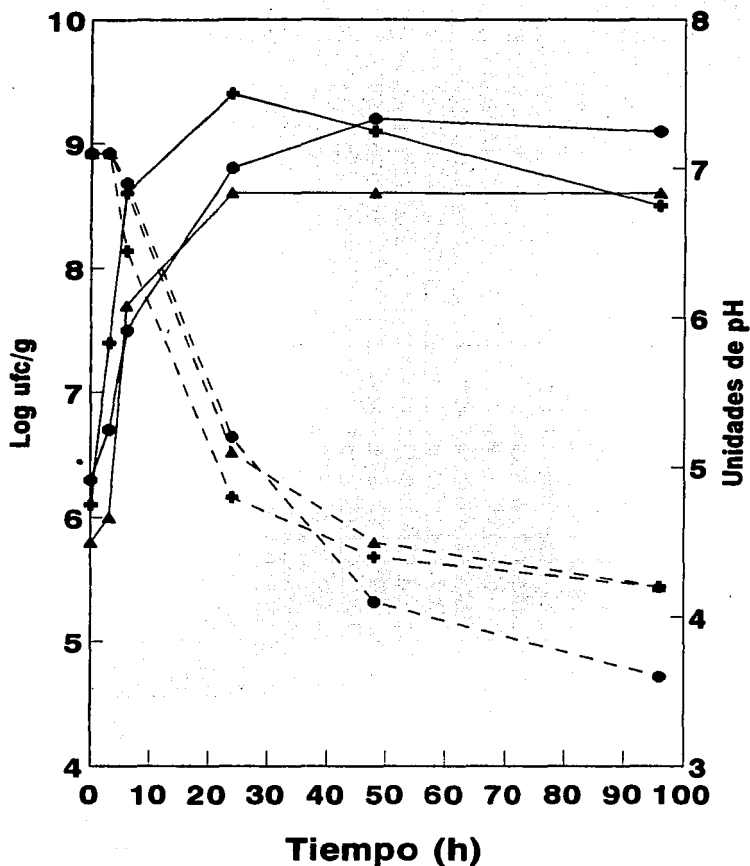
**Crecimiento microbiano.** En la Figura 7.6 se muestra que el crecimiento de cada una de las cepas, cuando se inocularon por separado en masa estéril, fue similar al obtenido en el experimento anterior. En la Figura 7.7 se presenta la evolución en las cuentas de las 3 cepas cuando se inoculó una mezcla de las mismas en masa estéril (Figura 7.7) y en masa no estéril (Figura 7.8). Se puede observar que en el segundo caso se partió de una cuenta inicial de aproximadamente  $10^4$  ufc/g de bacterias contaminantes (que al igual que en las fermentaciones tradicionales eran en su mayoría bacterias del género *Bacillus*: bacilos Gram positivo, esporuladas, catalasa positivo). Estas crecieron en las primeras horas y sus números disminuyeron ligeramente a partir de las 48 horas de fermentación. En las fermentaciones de las masas esterilizadas estas bacterias no se detectaron en ningún tiempo. El crecimiento de las bacterias lácticas en ambos sustratos fue similar, demostrando que en la masa irradiada no se habían formado sustancias que pudieran inhibir el crecimiento de estas bacterias. Las tres especies de bacterias crecieron simultáneamente en las primeras 24 horas de fermentación, con mayor velocidad las cepas

de *Leuconostoc* que la de *L. plantarum*, mostrando un comportamiento similar al obtenido en cultivo puro, y alcanzando cuentas similares a las de los cultivos puros en ese tiempo. A partir de las 48 horas de fermentación, mientras los números de *L. plantarum* permanecían constantes, los de las dos cepas de *Leuconostoc* se habían reducido. A diferencia de lo observado con cultivos puros, la cepa amilasa negativa presentó cuentas más altas que la amilasa positiva, cuando crecieron en cultivo mixto.

#### Cambios en los valores de pH y de acidez titulable de las masas durante la fermentación.

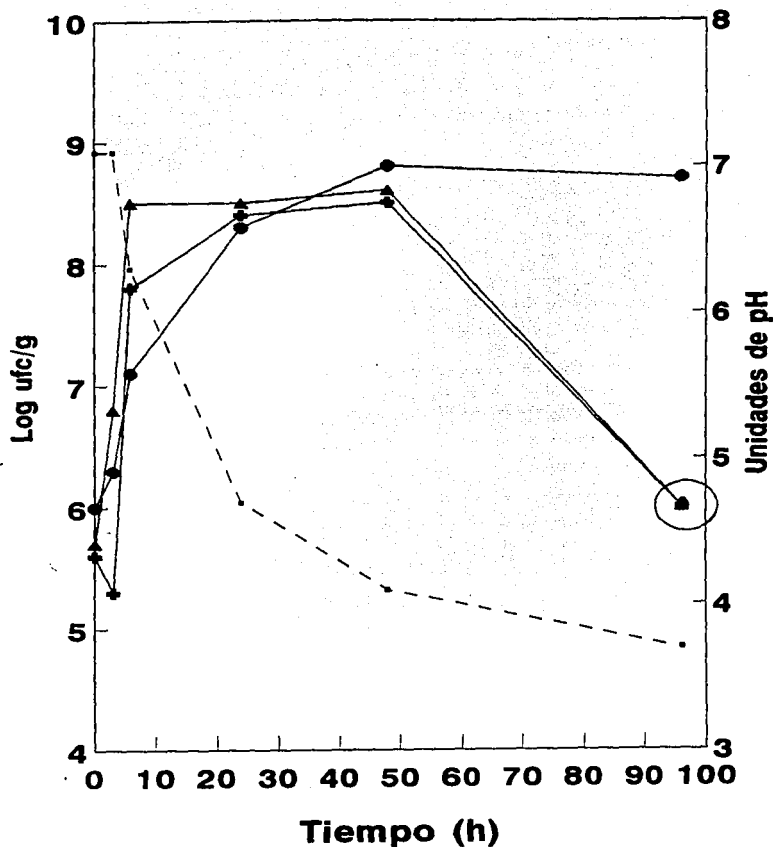
El valor de pH de las masas disminuyó a partir de la hora 3 de fermentación (Figuras 7.6, 7.7, 7.8). Cuando se inocularon las cepas por separado, hasta las 24 horas de fermentación el pH disminuyó más rápidamente en las masas inoculadas con la cepa de *L. mesenteroides* amilasa positiva que con las demás, pero a partir de este tiempo la disminución fue más rápida en el caso de *L. plantarum*. A las 96 horas el pH fue de 3.6 para *L. plantarum* y para *Leuconostoc* de 4.2. El comportamiento de las masas esterilizadas y no esterilizadas inoculadas con los cultivos mixtos fue idéntico, con una disminución de pH rápida a partir de las 3 horas y alcanzando valores bajos al final (3.7 en ambos casos). La acidez titulable (Figura 7.9) se incrementó a partir de las 6 horas de fermentación y hasta las 24 horas se obtuvieron valores similares para todos. Después de este tiempo la mayor concentración correspondió a las masas inoculadas con *L. plantarum*, la menor a las de los cultivos puros de *Leuconostoc* y valores intermedios para las inoculadas con los cultivos mixtos. Al igual que en el experimento anterior, el pH de las masas inoculadas con la cepa *L. mesenteroides* amilasa positiva fue menor que las inoculadas con la cepa amilasa negativa. La acidez titulable de las masas inoculadas con ésta fue mayor.

**Apariencia de las masas.** En todos los casos en que se inocularon las cepas heterofermentativas (*Leuconostoc*) se produjo una estructura esponjosa de la masa por la producción de gas a partir de las 24 horas de fermentación y en todos los casos se detectó un aroma frutal en las masas fermentadas.

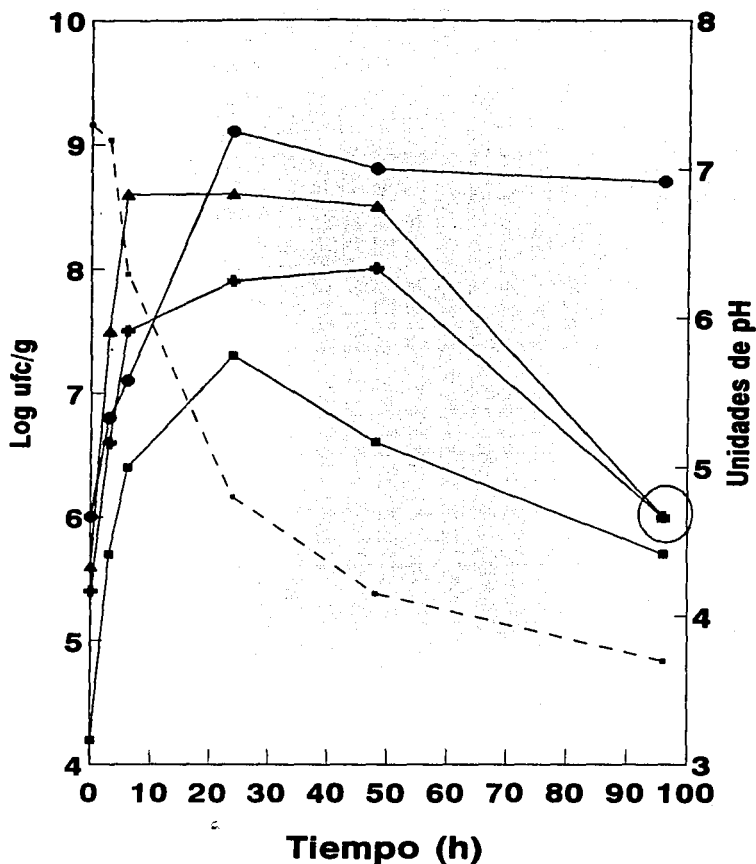


**Figura 7.6** Crecimiento (líneas sólidas) de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (†) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲) en cultivo puro, en nixtamal esterilizado, incubado a 30°C. El valor de pH de las mismas masas se indica con líneas punteadas.

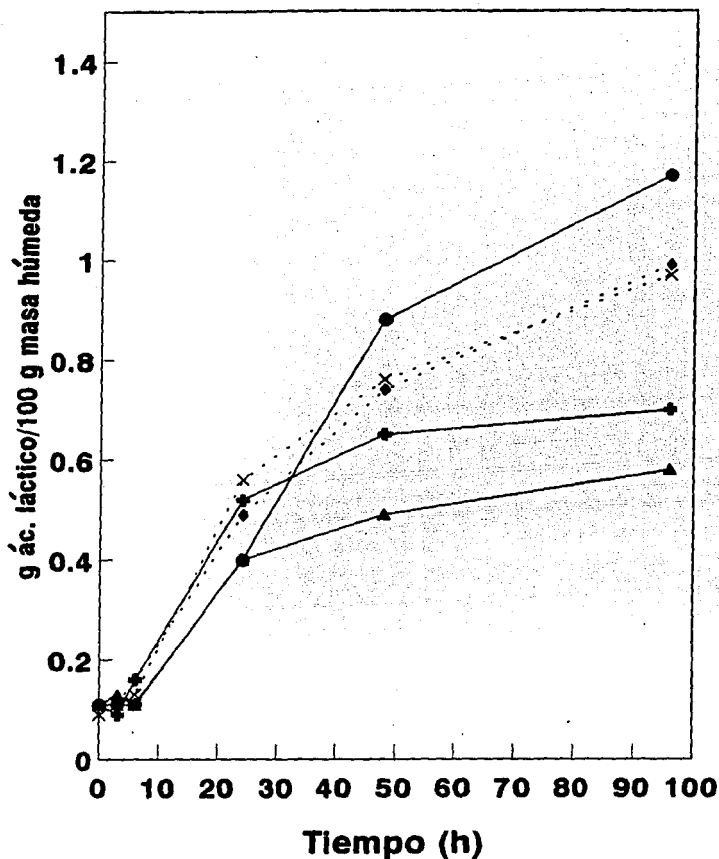




**Figura 7.7** Fermentación de nixtamal esterilizado, inoculado con el cultivo mixto e incubado a 30°C. Crecimiento (líneas sólidas) de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (✦) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲). Los puntos encerrados en un círculo indican que se obtuvieron cuentas menores al valor indicado. El valor de pH de las mismas masas se indica con líneas punteadas.



**Figura 7.8** Fermentación de nixtamal no esterilizado, inoculado con el cultivo mixto e incubado a 30°C. Crecimiento (líneas sólidas) de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (+), *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲) y bacterias contaminantes (■). Los puntos encerrados en un círculo indican que se obtuvieron cuentas menores al valor indicado. El valor de pH de las mismas masas se indica con líneas punteadas.



**Figura 7.9** Fermentación de nixtamal esterilizado y no esterilizado, inoculados con los cultivos puros y el cultivo mixto e incubados a 30°C. Cambios en los valores de acidez titulable de masas esterilizadas inoculadas con cepas puras de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (◻), *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲), un cultivo mixto de las tres cepas anteriores (◆) y de masas no esterilizadas inoculadas con el mismo cultivo mixto (X).

### 7.3.3 Experimento 3. Efecto de la nixtamalización en el crecimiento microbiano de las masas de maíz.

#### **Objetivo:**

Determinar si existen diferencias en el crecimiento de las cepas seleccionadas cuando se inoculan en una masa de maíz nixtamalizado (*pozol*) y una de maíz no nixtamalizado (*kenkey*).

**Características de la masa.** El pH del agua de remojo de los granos disminuyó de 7.1 a 4.9 y el de la masa de *kenkey* recién molida fue de 5.9. Esta contenía 51.2% de humedad y una actividad acuosa de 0.98. No se detectó la presencia de bacterias lácticas, bacterias contaminantes, mohos ni levaduras en la masa esterilizada.

**Crecimiento microbiano.** El crecimiento de las bacterias lácticas en cultivo mixto fue similar en masas de *kenkey* y de *pozol* esterilizadas (Figura 7.10 A y B). Las cepas de *Leuconostoc* crecieron más rápidamente que la de *L. plantarum* en ambos sustratos, pero la cepa amilasa positiva de *Leuconostoc* alcanzó mayores cuentas que la amilasa negativa en *kenkey*, a diferencia del *pozol*. Aunque no se cuenta con el número preciso de ufc/g de las cepas de *Leuconostoc* en el último muestreo de la fermentación, es evidente que las cuentas de estas cepas se redujeron más drásticamente en el *kenkey* que en el *pozol*. En el primero los números de *Leuconostoc* ya se habían reducido a las 48 horas, mientras que en el segundo permanecían constantes. Esta reducción coincide en ambos sustratos a partir de que se alcanza un valor de pH cercano a 4. El crecimiento de las bacterias lácticas en la masa de *kenkey* no esterilizada fue similar al de la masa esterilizada, pero las cuentas de *L. mesenteroides* amilasa positiva no excedieron a las de la cepa amilasa negativa (Figura 7.11).

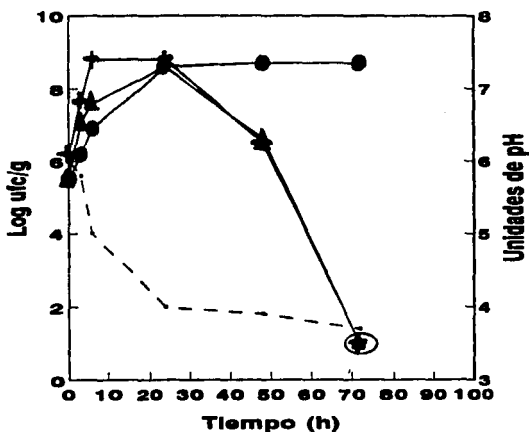
En la masa de *kenkey* esterilizada no se detectaron bacterias contaminantes en ningún tiempo y en la no esterilizada la cuenta inicial fue de  $3.7 \times 10^6$  ufc/g. Ésta aumentó hasta  $1.2 \times 10^7$  en las primeras 3 horas y se mantuvo hasta las 6 horas, pero en el siguiente muestreo (24h) ya no se detectaron, como puede observarse en la Figura 7.12. En cambio, en la masa de nixtamal no estéril (Figura 7.12), a pesar de que la cuenta inicial de bacterias contaminantes fue menor ( $1.7 \times 10^4$  ufc/g), éstas crecieron hasta  $1.9 \times 10^7$  hasta las 24 horas y a las 96 su cuenta era de  $5.3 \times 10^5$  ufc/g. Como puede apreciarse en la misma Figura, la inhibición de bacterias contaminantes ocurre en ambos sustratos a partir de que se alcanza un valor de pH de aproximadamente 5.

#### Cambios en los valores de pH y de acidez titulable de las masas durante la fermentación.

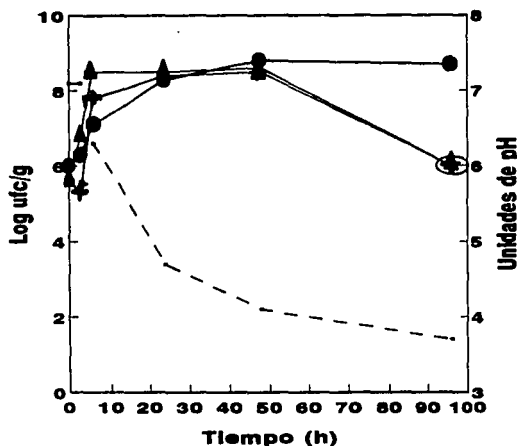
El pH inicial de las masas de *kenkey* (5.9) fue menor que el de las masas de nixtamal (7.0). Como se puede observar en la Figura 7.13A, el pH disminuyó desde el inicio de la fermentación, alcanzando valores menores que los obtenidos para las masas de nixtamal, en cada tiempo de fermentación. A las 48 horas el valor de pH de las masas de *kenkey* era de 3.8, mientras que el de las de nixtamal era de 4.1; el pH final de ambas fue igual (3.7). Durante las primeras 6 horas aumentó la acidez de las masas de *kenkey* y en las de pozol no se observaron cambios (Figura 7.13B). A partir de este tiempo se incrementó la acidez en ambas masas, pero más rápidamente en la de nixtamal. Después de las 48 horas ya no se produjo mayor acidez en la masa de *kenkey* que había sido esterilizada y su valor fue similar al de las masas de nixtamal. En ambas masas se obtuvo aproximadamente el mismo incremento en acidez titulable a partir de lo que se consideró como tiempo cero.

Apariencia de las masas. Al igual que en la fermentación de nixtamal, se observó la producción de gas a partir de las 24 horas de fermentación y la de un aroma frutal durante la fermentación de las masas de *kenkey*.

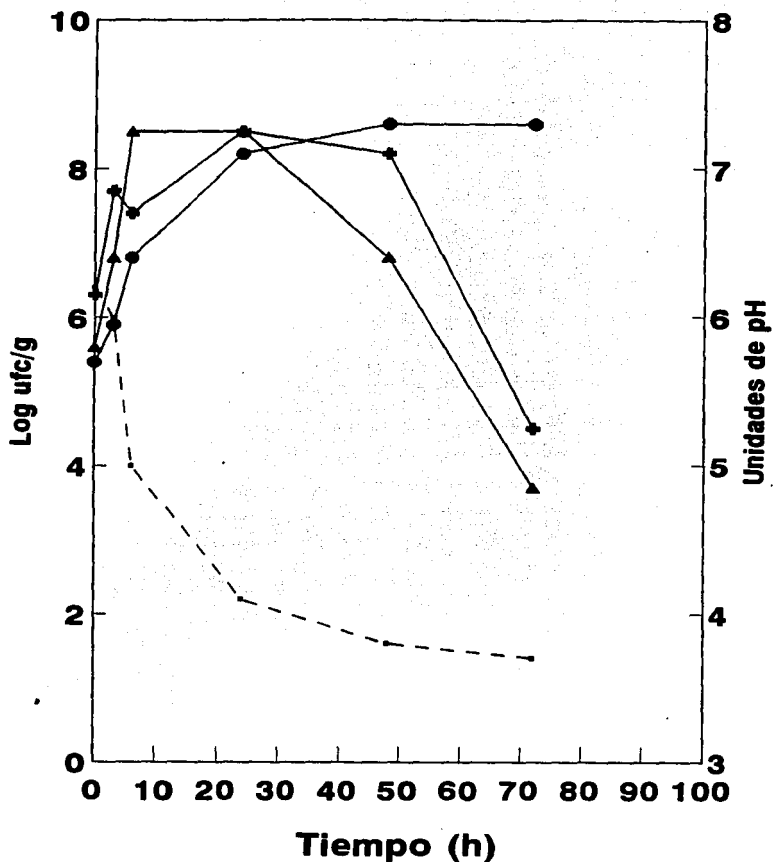
### A: Kenkey, sustrato estéril



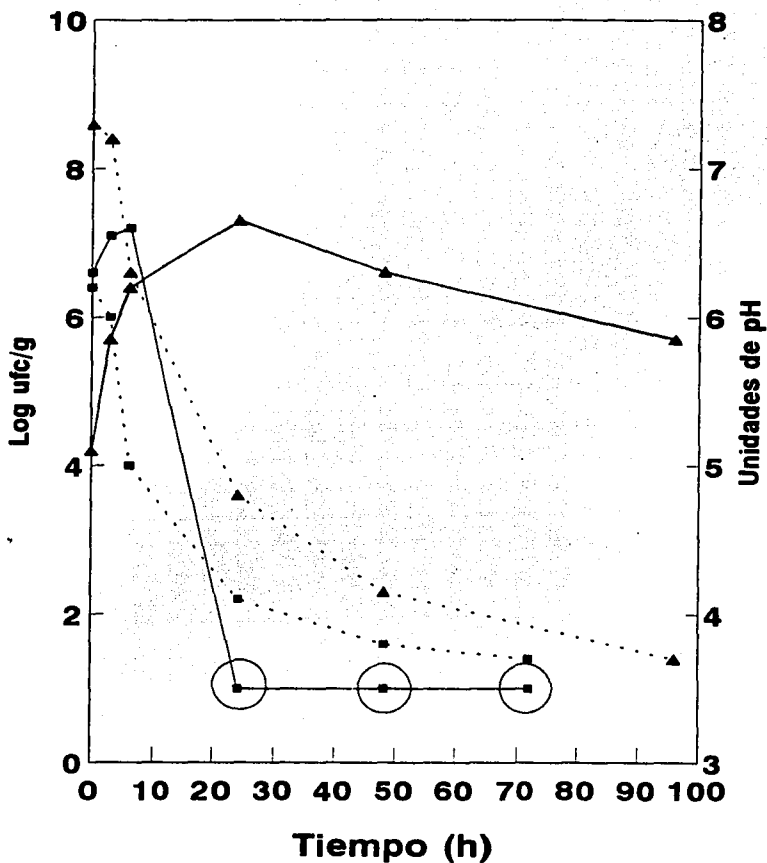
### B: Pozol, sustrato estéril



**Figura 7.10** Fermentaciones de masas de kenkey (A) y de pozol (B) esterilizadas, inoculadas con el cultivo mixto e incubadas a 30°C. Crecimiento de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (▲) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (◆). Los puntos encerrados en un círculo indican que se obtuvieron cuentas menores al valor indicado. Los valores de pH se indican con líneas punteadas.



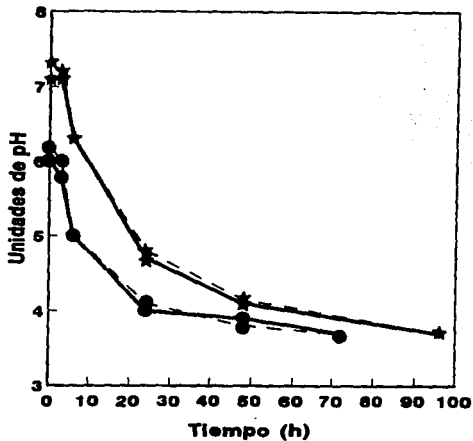
**Figura 7.11** Fermentación de la masa de *kenkey* no esterilizada, inoculada con el cultivo mixto e incubada a 30°C. Crecimiento de: *L. plantarum* (●), *L. mesenteroides* amilasa positiva (+) y *Leuconostoc* sp. amilasa negativa (▲). Los puntos encerrados en un círculo indican que se obtuvieron cuentas menores al valor indicado. El valor de pH se indica con líneas punteadas.



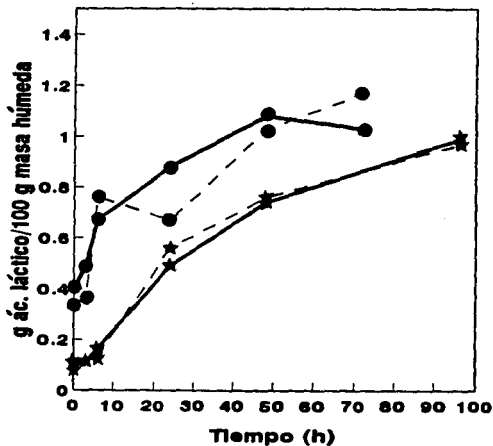
**Figura 7.12** Fermentaciones de masas de *kenkey* (■) y de *pozol* (▲) no esterilizadas, inoculadas con el cultivo mixto e incubadas a 30°C. El crecimiento de las bacterias contaminantes se muestra con líneas sólidas y los valores de pH correspondientes con líneas punteadas. Los valores correspondientes al *pozol* son los mismos de la Figura 7.8, que se repiten en ésta con fines de comparación.



### A: pH



### B: Acidez titulable



**Figura 7.13** Fermentación de masas de pozol (★) y de *kenkey* (●), esterilizadas (líneas sólidas) y sin esterilizar (líneas punteadas), inoculadas con el cultivo mixto e incubadas a 30°C. Cambios en los valores de pH (A) y de acidez titulable (B). Los valores correspondientes al pozol son los mismos de las Figuras 7.6, 7.7 y 7.8, que se repiten en ésta con fines de comparación.

## 7.4 DISCUSIÓN

### 7.4.1 Importancia de la actividad amilolítica de las bacterias lácticas en la fermentación del pozol.

Las tres cepas de bacterias lácticas crecieron rápidamente y hasta alcanzar números similares a los de las fermentaciones tradicionales cuando se inocularon tanto por separado como en cultivo mixto en masas de nixtamal esterilizadas. Esto indica que la masa de nixtamal contiene los nutrientes necesarios para que se desarrollen las bacterias lácticas y sugiere que la concentración del sustrato fermentable no es limitante. Se ha propuesto que en las fermentaciones de cereales es importante la acción de las bacterias del género *Bacillus*, que generalmente se encuentran presentes, para producir azúcares fermentables mediante la hidrólisis del almidón (Achi, 1990) e inclusive se ha logrado la integración y expresión de genes de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* en *Lactobacillus plantarum* para producir una cantidad estabilizante de ácido láctico en ensilados, donde la concentración de azúcares es demasiado baja (Scheirlinck y col., 1989). Con estos experimentos en nixtamal estéril se demostró que las bacterias del género *Bacillus*, que están presentes en la fermentación del pozol, no tienen esa función, ya que las bacterias lácticas se desarrollaron favorablemente en ausencia de ellas. Además, no existieron diferencias claras en el crecimiento de bacterias lácticas ni en la acidificación del medio tanto en presencia como en ausencia de *Bacillus*, observados en los medios sin esterilizar y esterilizado, respectivamente.

En la mayoría de las fermentaciones de maíz se cuenta con una concentración suficiente de azúcares fermentables. En el caso del *mageu*, donde se añade harina de trigo como fuente de amilasas, se encuentran de 0.3 a 0.6% de azúcares reductores en las masas (Holzapfel, 1989); el *ogi* contiene 1.3% de azúcares solubles, producidos probablemente por la acción de amilasas endógenas durante el remojo de los granos (Onyekwere y col., 1989).

A diferencia de estos procesos, no existe un paso en la elaboración del nixtamal que permita que actúen las enzimas endógenas del maíz para liberar azúcares fermentables, ya que éstas deben destruirse durante la cocción en agua con cal y posteriormente no se añade ningún ingrediente que pudiera aportar amilasas o carbohidratos simples. Por el contrario, la concentración de azúcares fermentables debe disminuir durante el proceso, ya que se pierden azúcares del maíz en las aguas de cocción y de lavados. Trejo-González y col. (1982) reportan una concentración de 14.5 g/l de azúcares totales en el nexayote (agua de cocción del nixtamal para la producción de tortillas).

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo indican que el único azúcar presente en la harina de nixtamal utilizada en los experimentos de esta sección es la sacarosa y que ésta se encuentra en una concentración de entre 0.1 y 0.4 g/ 100 g de materia seca (Santillana, comunicación personal). Como esta concentración es baja, comparada con la reportada para otros alimentos y el carbohidrato que se encuentra en mayor abundancia es el almidón, era de esperarse que su hidrólisis fuera importante para el desarrollo de las bacterias lácticas. Al obtener buen crecimiento y acidificación en masas esterilizadas e inoculadas con cepas sin actividad amilolítica, se demuestra que la hidrólisis del almidón no es un factor indispensable para la fermentación de la masa. Existen entonces varias posibilidades. Una de ellas es que la concentración de azúcares presente en las masas de nixtamal, aunque pequeña, sea suficiente para el desarrollo de las bacterias lácticas; otra, que exista otro sustrato diferente de los azúcares en el nixtamal, que las bacterias puedan fermentar.

Poolman (1993) reporta la existencia de sistemas de transporte dependientes de proteínas (ATPasas), que facilitan la toma de azúcares, que une los sustratos con una afinidad tan alta que permite el transporte eficiente en intervalos de concentración submicromolar y nanomolar. Esto hace pensar que las células podrían aprovechar concentraciones muy bajas de estos compuestos. Si en 100 g de masa seca existen 0.4 g de sacarosa (1.2 mmoles), las bacterias tendrían disponibles 1.2 mmoles de glucosa y 1.2 mmoles de

fructosa. De acuerdo con Nuraida (1992), *Leuconostoc* produce 1 mol de ácido láctico por mol de glucosa y 1 mol de ácido láctico y 1 mol de ácido acético por cada 3 moles de fructosa. Si la bacteria usara totalmente ambos azúcares, y suponiendo que la fructosa fuera el único aceptor de electrones alternativo, produciría 0.14 g de ácido láctico y 0.02 g de ácido acético por 100 g de masa seca, que equivalen a aproximadamente 0.06 g de ácido láctico y 0.01 g de ácido acético/100 g de masa húmeda, o a una acidez total de 0.06% en base húmeda, expresada como ácido láctico. Si existiera algún otro aceptor de electrones, como el  $O_2$ , se producirían a partir de cada glucosa y de cada fructosa una mol de ácido láctico y una de ácido acético (0.2 g de ácido láctico y 0.15 g de ácido acético por 100 g de masa seca, que equivaldrían a una acidez titulable de 0.16% en base húmeda, expresada como ácido láctico). La acidez titulable producida por la cepa no amilolítica, en las condiciones anaeróbicas del experimento fue de 0.58 g de ácido láctico/100 g de masa húmeda. Todo parece indicar que la concentración de sacarosa presente en la masa no es suficiente para acidificarla, por lo que no se descarta la posibilidad de que las bacterias lácticas puedan usar otro sustrato fermentable además de los azúcares. Se ha reportado que las bacterias lácticas pueden usar oligosacáridos (Olympia, 1992; Olympia y col., 1992) y fructanos (Müller y Lier, 1994), que pueden estar presentes en la masa y podrían ser usados como sustrato fermentable.

Giraud y col. (1993b) demostraron que una cepa de *Lactobacillus plantarum* amilolítica aislada de la yuca producía 25% más acidez titulable que una cepa no amilolítica de la misma especie, y esta diferencia se produjo después de que se acabaron los azúcares simples. En el nixtamal la diferencia en la producción de acidez entre la cepa amilolítica y la no amilolítica de *Leuconostoc*, cuando crecieron en cultivo puro, fue de entre 15 y 25%. La mayor acidificación lograda con la cepa amilolítica podría repercutir positivamente en la eliminación de microorganismos indeseables en la masa.

En cultivo puro, la cepa amilolítica de *Leuconostoc* creció hasta mayores números que la no amilolítica, pero se inhibió más rápidamente al final de la fermentación. En cultivo

mixto su crecimiento, en general, no fue mayor que el de la no amilolítica. Esto puede ser consecuencia de una mayor sensibilidad a la acidez. En este caso, en cultivo mixto, su contribución en la acidificación de la masa disminuiría, a pesar de su capacidad amilolítica.

La actividad amilolítica no es entonces indispensable para lograr la acidificación de las masas por fermentación láctica; no obstante, puede ser conveniente que las cepas la posean, ya que la mayor acidificación, si es aceptable en la bebida, podría contribuir en la eliminación de microorganismos indeseables.

#### **7.4.2 Diferencias en el crecimiento y modificación de la masa entre cultivos puros de cepas homo y heterofermentativas de bacterias lácticas y cultivos mixtos de las mismas.**

Ambos tipos de bacterias se desarrollaron bien en la masa. Las cepas de *L. mesenteroides* crecieron con mayor velocidad que las de *L. plantarum* al inicio de la fermentación, lo cual indica que el nixtamal es un sustrato que favorece el crecimiento de las primeras. Si existe sacarosa en la masa, *Leuconostoc* puede usar la fructosa como aceptor de electrones y de esta manera producir más ATP (Nuraida, 1992), que puede tener como consecuencia una velocidad de crecimiento mayor para las bacterias de este género. Ésta puede ser la razón por la que en el pozol *Leuconostoc* inicia la fermentación, al igual que en otras fermentaciones de productos vegetales.

Las diferencias entre las masas inoculadas con los cultivos puros de las cepas homo y heterofermentativas fueron la producción de mayor acidez y menor valor de pH en las primeras y la producción de gas en las segundas. Es bien sabido que esto se debe a que las cepas homofermentativas convierten la mayor parte de la glucosa en ácido láctico mediante la vía de Embden Meyerhoff, mientras que las heterofermentativas, al no poseer la enzima fructosa difosfato aldolasa, no pueden metabolizar los azúcares por esta vía,

produciendo ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub> mediante la vía de la fosfoacetolasa (Doelle, 1981).

El pH final de las masas inoculadas con *L. plantarum* fue menor que el de las inoculadas con *Leuconostoc*. Con el cultivo mixto los valores de acidez titulable de las masas inoculadas fueron intermedios entre los de las inoculadas con las cepas homo y heterofermentativas. Esto puede ser el resultado de que en el cultivo mixto parte del sustrato fermentable es utilizado por las cepas heterofermentativas, que producen otros metabolitos además de los ácidos.

Cuando las cepas de *Leuconostoc* crecieron en cultivo puro, se incrementaron sus números hasta las 24 horas de fermentación, cuando el pH de las masas era de 5; después de este tiempo se mantuvieron constantes. En cambio, *L. plantarum* continuó creciendo hasta las 48 horas, cuando el pH de la masa era cercano a 4. McDonald y col. (1990) estudiaron la tolerancia a los ácidos de estas bacterias, encontrando que el crecimiento de *L. mesenteroides* se detiene a valores de pH de 5.5 a 5.7 y el de *L. plantarum* de 4.6 a 4.8. Con los resultados de estos experimentos con nixtamal se confirmó la mayor tolerancia al pH bajo de *L. plantarum*, que es a lo que se ha atribuido el hecho de que muchas fermentaciones sean terminadas por bacterias del género *Lactobacillus*.

En cultivo mixto los números de *Leuconostoc* se mantuvieron constantes de las 24 a las 48 horas, pero a las 96 horas se habían reducido. Esto puede deberse a la mayor acidez producida por *L. plantarum*. Yildiz y Westhoff (1981) reportan también la baja capacidad de competencia de cepas de *Leuconostoc* cuando crecen en asociación con otros cultivos de bacterias lácticas.

Además de modificar la textura de la masa, haciéndola más esponjosa, la producción de CO<sub>2</sub> por parte de las cepas heterofermentativas podría ser importante para arrastrar el oxígeno residual y crear un ambiente más favorable para el desarrollo de las bacterias lácticas, como se ha propuesto en Stamer (1979); sin embargo en este trabajo no se

favoreció el crecimiento de *L. plantarum* cuando creció en presencia de las cepas heterofermentativas.

La producción de un aroma frutal, que ya había sido reportada en fermentaciones de nixtamal inoculadas con cultivos mixtos (Ramírez, 1987) y en otras fermentaciones lácticas (Lee y col., 1992), es otra contribución de las bacterias lácticas en la fermentación del pozol.

Tanto en los cultivos puros como en los mixtos, se observó que aún cuando los números de estas bacterias ya no aumentan, los valores de pH continúan disminuyendo y los de acidez titulable incrementándose. Este fenómeno fue reportado para *L. plantarum* por Giraud (1993), quien considera que la bacteria es capaz de realizar un desacoplamiento energético entre el crecimiento y la producción del ácido láctico.

#### **7.4.3 Efecto de la nixtamalización en el desarrollo de las bacterias lácticas y de las bacterias contaminantes.**

A pesar de que deben existir más azúcares en la masa de *kenkey* que en la de pozol debido a la posibilidad de acción de amilasas endógenas durante el remojo de los granos para la producción del *kenkey*, y a la pérdida de azúcares en el nexayote, las bacterias lácticas crecieron hasta números similares en ambas y produjeron una acidez titulable similar en los dos sustratos al final de la fermentación. Esto sugiere nuevamente que la concentración del sustrato fermentable no es limitante en ninguna. La diferencia entre ambas fue que durante la fermentación se mantuvo un valor de pH mayor en las masas de pozol que en las de *kenkey*. Es posible que esto se deba a que en la masa del pozol queda hidróxido de calcio residual del proceso de nixtamalización que neutraliza al principio de la fermentación los ácidos producidos por las bacterias lácticas. La consecuencia de esto es que, al alcanzarse en la masa de *kenkey* más rápidamente valores de pH bajos, las bacterias contaminantes se inhiben rápidamente en el *kenkey*, mientras que en el pozol se detectan aún al final de la fermentación. Los números de las bacterias lácticas también

disminuyen más rápidamente en el *kenkey*. Se ha demostrado que el ácido acético tiene mayor capacidad inhibitoria que el láctico (Nuraida, 1992), por lo que otra posibilidad es que en el *kenkey* se estuviera produciendo más ácido acético que en el pozol.

## 7.5 CONCLUSIONES

Con estos estudios, utilizando un modelo de la fermentación del pozol, fue posible determinar la participación e importancia de cepas representativas de bacterias lácticas, así como el efecto de la nixtamalización en la propagación de los microorganismos:

1. La función de las cepas de *L. mesenteroides* es la acidificación rápida en las primeras horas de la fermentación, así como la producción de la textura esponjosa de la masa y *L. plantarum* contribuye produciendo valores grandes de acidez. Ambas cepas contribuyen en la producción del aroma frutal del producto.
2. La actividad amilolítica de las bacterias lácticas no es indispensable para su crecimiento en la masa de nixtamal y para la acidificación de la misma, por lo que se propone que: i) la concentración de azúcares directamente fermentables no es limitante, o ii) las bacterias utilizan otro sustrato fermentable diferente de los anteriores.
3. La única diferencia en el crecimiento de las tres cepas en cultivo puro y mixto fue la inhibición de las cepas de *L. mesenteroides* en cultivo mixto después de los 2 días de fermentación, probablemente como resultado de la acidez producida por *L. plantarum*.
4. El desarrollo y propagación de las bacterias lácticas es similar en un material nixtamalizado (pozol) que en uno sujeto exclusivamente a remojo (*kenkey*).



5. La nixtamalización del maíz tiene como resultado una fermentación con ambientes menos inhibitorios para las bacterias (tanto las del género *Leuconostoc*, como las contaminantes), en relación a muestras sin nixtamalizar.

## Capítulo 8

### CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo se realizó con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la microbiología del pozol, y para esto se seleccionó como área de estudio el estado de Chiapas, donde el consumo de esta bebida es generalizado. Antes de llevar a cabo el estudio microbiano, se investigaron su método de elaboración y las variaciones en el mismo en la zona Altos de Chiapas. La producción de este alimento es a nivel casero y para el consumo familiar, pero en ocasiones se obtiene en mayor cantidad, para comercializarlo. Después de observar los procesos de productores familiares y comerciales de la ciudad de San Cristóbal de las Casas y alrededores, se concluyó que, aunque existen variaciones en cada una de las diferentes etapas de la elaboración, la más importante es la que distingue al pozol indígena del mestizo. Ésta, que es probablemente una modificación de los mestizos para disminuir el residuo fibroso de la bebida, consiste en una cocción adicional de los granos de maíz después de la nixtamalización y resulta en una masa de apariencia diferente a la producida con el método indígena.

Durante el proceso no se inocula la masa, ni se añade una porción de alimento de una fermentación anterior. Debido a esto, la modificación del sustrato depende de los microorganismos que se encuentren naturalmente en él, y por esta razón se estudió la microbiología de las masas recién preparadas. Al encontrar cuentas muy similares de cada uno de los diferentes grupos microbianos en diferentes lotes de masa del mismo productor, en masas de diferentes productores de la misma región y de dos regiones diferentes, se concluyó que la microbiota inicial de la masa de nixtamal para producir pozol es estable. Esto confirma hallazgos previos de que en las fermentaciones antiguas

con cultivos mixtos, aunque sean preparadas por individuos sin conocimientos de microbiología, se encuentran siempre las mismas (o casi las mismas) mezclas de microorganismos.

Por otra parte, y debido a que se cuenta con poca información al respecto, se estudió la bacteriología de estas masas. Se realizó una caracterización fisiológica de las bacterias lácticas presentes, detectando algunas cepas capaces de hidrolizar el almidón, que es el principal carbohidrato de las masas, y una predominancia de cepas heterofermentativas. Se aislaron bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, en orden decreciente de predominancia numérica. Además de estas bacterias, cuyo papel en la fermentación debe ser el más importante, debido a la naturaleza ácida del mismo, se detectaron otros dos grupos, las enterobacterias y las del género *Bacillus*. Dentro de las primeras, que se identificaron hasta especie, se aislaron algunas asociadas con la producción de vitaminas en otros alimentos y con la fijación de nitrógeno en el pozol, pero no se encontraron los patógenos más comúnmente asociados con enfermedades gastrointestinales transmitidas a través de alimentos.

Los números iniciales de bacterias lácticas en las masas fueron muy altos, pero los números de los grupos de enterobacterias y de mesófilos no lácticos (*Bacillus*), cuya presencia en la fermentación se considera indeseable, por poder incluir patógenos, también fueron altos. Debido a esto se realizó un estudio para identificar las fuentes de inóculo de estos grupos. La fuente de inóculo más importante de todos los grupos microbianos fue la molienda, con contribuciones menores del remojo, de la superficie sobre la que se amasa y del aire. Se demostró que observando ciertas medidas higiénicas simples es posible obtener una masa libre de los grupos microbianos indeseables; sin embargo, estas medidas reducen también los números de bacterias lácticas necesarias para

la fermentación. Debido a esto sería necesaria la inoculación de un cultivo iniciador o una porción de masa de una fermentación previa.

Se estudió la dinámica del crecimiento microbiano en masas indígenas y mestizas y se observó el crecimiento de todos los grupos microbianos que estaban presentes en la masa recién preparada. A diferencia de la mayoría de las fermentaciones lácticas, en las que tanto las bacterias del género *Bacillus* como las enterobacterias detienen su crecimiento cuando el sustrato se acidifica, en el pozol estos dos grupos microbianos permanecieron en la masa aún después de 9 días de fermentación. El desarrollo de las bacterias lácticas y de las enterobacterias fue similar en el interior y en la superficie de la masa, donde se supone que existe mayor aireación, pero los grupos más aerobios de mohos, levaduras y bacterias mesófilas aerobias crecieron más en la superficie. Esto sugiere que el ataque a la masa nixtamalizada es compartimentalizado y distinto entre las zonas que lo constituyen.

A pesar de que se espera que exista una mayor pérdida de azúcares fermentables en el pozol mestizo, debido a la etapa adicional de cocción de este método, el desarrollo de bacterias lácticas fue similar en este tipo de masas y en las indígenas; sin embargo las últimas se acidificaron hasta niveles más bajos que las primeras.

Las fermentaciones naturales, como la del pozol, son difíciles de controlar y con frecuencia su calidad es variable; para controlarlas es necesario comprender el proceso de fermentación. La complejidad de esta fermentación, debida a la composición química del sustrato, su estado físico, la heterogeneidad en las condiciones de aireación y la variedad de microorganismos involucrados en el cultivo mixto, la convierte en un modelo interesante para el estudio de interacciones microbianas. Debido a esta complejidad, es difícil interpretar los cambios que ocurren durante el desarrollo del consorcio microbiano

integrante del cultivo mixto. Se desarrolló entonces una fermentación modelo con cultivos puros de bacterias lácticas, con masa esterilizada por radiaciones y con condiciones anaeróbicas homogéneas. Se demostró que las bacterias lácticas no necesitan de otro microorganismo para desarrollarse favorablemente en la masa de nixtamal y que pueden desarrollarse aunque no cuenten con la capacidad de hidrolizar almidón. Ésta les confiere a las cepas de *Leuconostoc* una ventaja de crecimiento y mayor acidificación del sustrato sobre aquéllas sin este fenotipo. La sinergia entre estas cepas parece estar clara: la actividad de las cepas de *Leuconostoc* es importante para acidificar rápidamente la masa al principio de la fermentación y para producir una textura esponjosa en la masa, mientras que *Lactobacillus* permite alcanzar niveles altos de acidez. Con un cultivo mixto que incluyó a ambas, la masa se acidificó rápidamente al principio y alcanzó niveles altos de acidez, aunque las cepas de *Leuconostoc* se inhibieron después de dos días de fermentación. Otra contribución importante de ambas bacterias fue la producción de un aroma frutal.

Se estudió el efecto de la nixtamalización (vs. tratamiento de remojo no alcalino) en el desarrollo de las bacterias lácticas, haciendo uso del mismo modelo. Para esto se comparó la fermentación del pozol con la del *kenkey*, alimento africano que se prepara por fermentación de una masa de maíz sin nixtamalizar. El crecimiento de las bacterias lácticas fue similar en ambas masas, pero la inhibición tanto de estas bacterias como de las del género *Bacillus* presentes en las masas no esterilizadas fue más marcada en la masa sin nixtamalizar. Esto permite concluir que la nixtamalización le confiere a la masa un ambiente menos inhibitorio que influye en la viabilidad prolongada de las bacterias. Este aspecto es de suma importancia, ya que implica que los ácidos producidos no confieren la misma protección contra microorganismos indeseables en el pozol que en otros alimentos fermentados. Como consecuencia de ésto, el establecimiento de prácticas higiénicas durante su elaboración es esencial; asimismo, sería importante la participación en la

fermentación de bacterias lácticas, que además de los ácidos produzcan otras sustancias antimicrobianas.

El hecho de que las bacterias lácticas se desarrollen por igual en las masas indígenas y en las mestizas junto con el resto de la microbiota natural, en las masas de nixtamal esterilizado en cultivo puro y en las preparadas con maíz remojado y molido (sin nixtamalizar) sugiere que la concentración del sustrato fermentable no es limitante en ningún caso. Queda por determinar si este sustrato es el conjunto de azúcares simples, cuya concentración en el nixtamal es baja, o si las bacterias lácticas están utilizando algún otro componente de la masa.

Con este trabajo se logró un avance en la comprensión de algunos de los eventos ecológicos que ocurren durante la fermentación del pozol. Se estudió principalmente la bacteriología, profundizando en la fermentación láctica, que es esencial en esta fermentación natural. Con el objetivo de seguir avanzando en la comprensión de la fermentación del pozol, se propone estudiar los siguientes aspectos de la misma:

1. Determinar la concentración de azúcares simples en los diferentes tipos de masas recién preparadas y en fermentación, así como la concentración de los principales metabolitos finales asociados a la fermentación (ácido láctico, ácido acético, etanol, diacetilo).
2. Establecer cuál es el sustrato que sustenta el crecimiento de las bacterias lácticas durante la fermentación. Para esto deberá determinarse si la concentración de azúcares simples presentes en la masa es suficiente para su acidificación, así como la posibilidad de fermentación de otros sustratos no tan evidentes.

3. Estudiar las bacterias lácticas amilolíticas del pozol. Existe poca información sobre las bacterias lácticas que poseen esta propiedad, por lo que sería de interés determinar cómo degradan el almidón, las propiedades de sus amilasas y la genética involucrada. Aunque existen reportes, es poco común esta propiedad en el género *Leuconostoc*, aislado en este trabajo. Sería importante investigar la capacidad de *Lactobacillus* amilolíticos para producir mayor acidez en el pozol, comparándolos con *Lactobacillus* no amilolíticos.

4. Estudiar los factores que afectan la sobrevivencia de patógenos, mediante pruebas de reto al inocular en las masas cepas de microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales, incluyendo el efecto de la capacidad amortiguadora del sustrato y de la difusión de los ácidos en su eliminación.

5. Seleccionar cepas que produzcan sustancias antimicrobianas, además de los ácidos, que actúen contra microorganismos patógenos y estudiar de su acción en las masas de nixtamal.

6. Buscar actividades enzimáticas en las bacterias lácticas que pudieran contribuir en la modificación del sustrato (lipolítica, proteolítica, pectinolítica), así como la producción de aromas y sabores.

Debido a la complejidad de la fermentación, y para profundizar en el estudio de su ecología, sería importante mejorar algunas metodologías, por ejemplo, mediante el uso de métodos moleculares sería posible realizar una caracterización más precisa de los microorganismos participantes.

## Capítulo 9

### REFERENCIAS

Achi O.K. (1990) Microbiology of 'obiolor': a Nigerian fermented non-alcoholic beverage. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 321-325.

Akinrele I.A. (1970) Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21, 619-625.

Álvarez-Suárez E. y Leal-Lara H. (1993) Adaptación de la fermentación del pozol al enriquecimiento proteico de subproductos agrícolas. En: *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 123-129.

Andah A. y Muller H.G. (1973) Studies on koko, a Ghanaian fermented maize porridge. *Ghana Journal of Agricultural Science* 6, 103-108.

Archivald F.S. y Fridovich I. (1981) Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 146(3), 928-936.

Banigo E.O.I., Onyekwere O.O. y Akinrele I.A. (1983) Nigerian ogi. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp189-198.

Barrel, R.A.E. y Rowland M.G.M. (1979) Infant foods as a potential source of diarrhoeal illness in rural West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 85-90.

Bassit N., Boquien C.Y., Picque D. y Corrieu G. (1993) Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6), 1893-1897.

Boyer C.D. y Shannon J.C. (1987) Carbohydrates of the kernel. En: *Corn: Chemistry and Technology*. Watson S.A. y Ramstad P.E. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, pp 253-272.



Chunjian L., Bolsen K.K., Brent B.E. y Fung D.Y.C. (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *Journal of Applied Bacteriology* 73(5), 375-387.

Campos S., Ruiz A. y Zúñiga J. (1982) *La automedicación en indígenas y mestizos: el caso de Tenejapa, Chiapas*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México. p 17.

Capparelli E. y Mata L. (1975) Microflora of maize prepared as tortillas. *Applied Microbiology* 29(6), 802-806.

Casalino M., Yusuf M.W., Nicoletti M., Bazzicalupo P., Coppo A., Colonna B., Cappelli C., Bianchini C., Falbo V., Ahmed H.J., Omar K.H., Maxamuud K.B. y Maimone F. (1988) A two-year study of enteric infections associated with diarrhoeal diseases in children in urban Somalia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 637-641.

Casillas L.E. y Vargas L.A.. (1984) La alimentación entre los mexicanos. En: *Historia General de la Medicina en México*, Tomo I, México Antiguo, F. Martínez Cortés (Ed.). Academia Nacional de Medicina y Facultad de Medicina, UNAM, México, pp 133-156.

Champ M., Szyllit O., Raibaud P. y Ait-Abdelkader N. (1983) Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 487-493.

Cherrington C.A., Hinton M., Mead G.C. y Chopra I. (1991) Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. En: *Advances in Microbial Physiology*. Vol 32. Academic Press, Londres, pp 87-108.

Christian W.F.K. y Nyako K.O. (1983) Ghanaian kenkey. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 220-226.

Condon S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 269-280.

Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G., y Guzmán G.J. (1955) El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia Méx.*, 15, 27-30.

Cravioto A., Reyes R.E., Ortega R., Fernández G., Hernández R. y López D. (1988) Prospective study of diarrheal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first 2 years of life. *Epidemiology and Infection* 101, 123-134.

Cruz Ulloa S. y Ulloa M. (1973) Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 24, 423-457.

Daeschel M.A., Andersson R.E. y Fleming H.P. (1987) Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 357-367.

Daeschel M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 43(1), 164-167.

Doelle H.W. (1981) Basic metabolic processes. En: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise, Vol. 1*. H.J. Rhem y G. Reed (Eds.). Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, pp 113-233.

Escamilla-Hurtado M.L., Velázquez-Corona J.R., Virgen-García M.I., Oropeza-Beivide N.C., Vázquez-Osorno M.E. y Brouzes F. (1991) *Manual Productos Fermentados Tradicionales de Maíz*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Instituto Nacional del Consumidor, Dirección General de Culturas Populares, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, 39 pp.

Escamilla-Hurtado M.L. y Mozqueda-González E. (1992) Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnología de Alimentos (México)* 27(1, 2 y 3), 37-41.

Escamilla-Hurtado M.L., Olgún-Lora P. y Prado-Barragán L.A. (1993a) Nota. Fermentación láctica en el atole de maíz agrio del grupo étnico tzotzil. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33(5), 554-564.

Escamilla-Hurtado M.L., Prado-Barragán L.A., López-Baca A. y Velázquez-Corona J.R. (1993b) Determinación del efecto del basiawi (*Bromus arizonicus*) en cultivos axénicos de cepas aisladas del tesguino. En: *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 87-91.

Fleming H.P. (1982) Fermented Vegetables. En: *Fermented Foods* A.H. Rose (Ed.). Economic Microbiology, Vol. 7. Academic Press, Londres, pp 227-258.

Fuentes I., Herrera T. y Ulloa M. (1974) Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *neapolitana* aisladas del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 16, 99-103.

Garvie E.I. (1960) The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *Journal of Dairy Research* 45, 283-292.

Gashe B.A. (1985) Involvement of lactic acid bacteria in the fermentation of tef (*Eragrostis tef*), an Ethiopian fermented food. *Journal of Food Science* 50, 800-801.

Gatumbi R.W., Muriru N. y Mbugua S.K. (1983) Kenyan uji. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York., pp 198-203.

Giraud E., Brauman A., Keleke S., Lelong B. y Raimbault M. (1991) Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 379-383.

Giraud E. (1993) *Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de Lactobacillus plantarum amylolytique isolée du manioc fermenté*. These pour obtenir le grade de docteur-mention sciences. Université de Provence Aix-Marseille I. 139 pp.

Giraud E., Gosselin L., Marin B., Parada J.L. y Raimbault M. (1993a) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 276-282.

Giraud E., Gosselin L. y Raimbault M. (1993b) Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**, 77-82.

Girma M., Gashe B.A. y Lakew B. (1989) The effect of fermentation on the growth and survival of *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* in fermenting tef (*Eragrostis tef*). *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5**, 61-66.

Haggblade S. y Holzapfel W.H. (1989) Industrialization of Africa's indigenous beer brewing. En: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 191-283.

Halm M., Lillie A., Sorensen A.K. y Jakobsen M. (1993) Microbiological and aromatic characteristics of maize doughs for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 135-143.

Harrigan W.F. y McCance M. (1976) *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press, Londres.

Hayashi U., Ota T., Sundhagel M., Smanmathuroj P. y Bhadacharen W. (1983) Miscellaneous oriental fermentations. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 530-547.

Heron S.J.E., Wilkinson J.F. y Duffus C.M. (1993) Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 13-17.

Herrera T. y Ulloa M. (1975) Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 17, 143-147.

Herrera T. (1993) Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 21-27.

Hesseltine C.W. y Wang H.L. (1979) Fermented foods. *Chemistry and Industry* 12, 393-399.

Hesseltine C.W. y Wang H.L. (1986) Food fermentation research and development. En: *Indigenous Fermented Foods of Non-western Origin*. C.W. Hesseltine y H.L. Wang (Eds). J. Cramer, Berlín, pp 317-344.

Hesseltine C.W. (1992) Mixed-culture fermentations. En: *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development, Office of International Affairs, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. pp 52-57.

Holzapfel W.H. (1989) Industrialization of maguey fermentation in South Africa. En: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 285-328.

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 mawe, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology* 18, 279-287.

Jay J.M. (1992) *Modern Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold. N. York, pp 236, 242.

Keuth S. y Bisping B. (1993) Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 427-434.

Kramer J.M. y Gilbert R.J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: *Foodborne Bacterial Pathogens*. Doyle M.P. (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 22-70.

Lappe P. y Ulloa M. (1989) *Estudios Étnicos, Microbianos y Químicos del Tescüino Tarahumara*. Instituto de Biología, UNAM, México.

Leal H., Wachter M.C., Álvarez E., López A. y Saint-Phard C. (1987) Estudio de cambios en el contenido proteico de subproductos agrícolas por fermentación con

microfloras mixtas. *Memorias del Simposio Latinoamericano Biotecnología para la producción de biomasa y Tratamiento de Desperdicios*. Antigua, Guatemala, pp 289-304.

Lee C.H., Min K.C., Souane M. y Chung M.J. (1992) Fermentation of prefermented and extruded rice flour by the lactic acid bacteria from sikhæe. *Food Biotechnology* 6(3), 239-255.

Leyva J.A. (1988) Somos lo que comemos. *ICYT*, 144, 36.

Lindgren S. y Refai O. (1984) Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *Journal of Applied Bacteriology* 57, 221-228.

Loeza-Chávez N.A. y Wachter-Rodarte M.C. (1993) La fermentación del pozol: efecto del tratamiento térmico alcalino del maíz. En: *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 103-108.

Lorri W. y Svanberg U. (1992) The potential role of fermented cereal gruels in reduction of diarrhoea among young children. En: *IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods - Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991*. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.). Echanis Press, Manila, pp 33-38.

Mbugua S.K. y Njenga J. (1992) Antimicrobial properties of fermented *uji* as a weaning food. En: *IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods - Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991*. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.). Echanis Press, Manila, pp 63-67.

McDonald L.C., Fleming H.P. y Hassan H.M. (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(7), 2120-2124.

McDonald L.C., Fleming H.P. y Daeschel M.A. (1991) Acidification effects on microbial populations during initiation of cucumber fermentation. *Journal of Food Science* 56(5), 1353-1359.

Mensah P.P.A., Tomkins A.M., Drasar B.S., y Harrison T.J. (1988) Effect of fermentation on Ghanaian Maize dough on the survival and proliferation of 4 strains of *Shigella flexneri*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 635-636.

Mensah P.P.A., Tomkins A.M., Drasar B.S., y Harrison T.J. (1990) Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. *Lancet* 336, 140-143.

- Mensah P., Tomkins A.M., Drasar B.S. y Harrison T.J. (1991) Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 203-210.
- Mercier P., Yerushalmi L., Rouleau D. y Dochain D. (1992) Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **55**, 111-121.
- Mozqueda-González E. y Escamilla-Hurtado L. (1988) Chemical and microbiological study of lactic acid fermentation in pozol (a Mexican corn-based beverage). En: *Proceedings of the seminar: Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-industrial Raw Materials*. M. Rimbault (Ed.), ORSTOM, 25, 26, 27 julio, Montpellier.
- Muller H.G. (1970) Traditional cereal processing in Nigeria and Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science* **3**, 187-195.
- Müller M. y Lier D. (1994) Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 406-411.
- Muñoz-González D. y Viniegra-González G. (1981) Fijación de nitrógeno atmosférico por un cultivo mixto de una bacteria láctica y *Azotobacter chroococcum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **23**, 213-217.
- Nakamura L.K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31** (1), 56-63.
- Nanson N.J. y Fields M.L. (1982) Effect of *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas maltophilia* singly and in combination on the relative nutritive value of fermented corn meal. *Journal of Food Science* **47**, 1294-1295.
- Ngaba P.R. y Lee J.S. (1979) Fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Science* **44**, 1570-1571.
- Nieto E. y Vázquez E. (1993) Las fermentaciones tradicionales del maíz. Resultados de una encuesta. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 47-51.
- Nout M.J.R., Rombouts F.M. y Havelaar A. (1989a) Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **8**, 351-361.
- Nout M.J.R., Rombouts F.M. y Hautvast G.J. (1989b) Accelerated natural lactic fermentation of infant food formulations. *Food and Nutrition Bulletin* **11**(1), 65-73.

- Nout M.J.R. (1992) Weaning foods for tropical climates. En: *IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods - Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991*. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.). Echanis Press, Manila, pp. 23-31.
- Nuraida L. (1988) *Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough*. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 80 pp.
- Nuraida L. (1992) *Metabolic studies on lactic acid bacteria*. PhD thesis, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 237 pp.
- Nuraida L., Grigolava I., Owens J.D. y Campbell-Platt G. (1992) Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc spp.* *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 517-522.
- Ofuya C.O. y Nnajiocfor C. (1989) Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 37-42.
- Ogunsua A.O., Okafor N., Onyekwere O.O. y Akinrele I.A. (1983) Nigerian gari. En: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 208-220.
- Okafor N. (1977) Micro-organisms associated with cassava fermentation for gari production. *Journal of Applied Bacteriology* **42**, 279-284.
- Okafor N., Ijioma B. y Oyolu C. (1984) Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. *Journal of Applied Bacteriology* **56**, 1-13.
- Olympia M.S.D. (1992) Fermented fish products in the Philippines. En: *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development, Office of International Affairs, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. pp 131-139.
- Olympia M., Ono H., Shinmyo A. y Takano M. (1992) Lactic acid bacteria in a fermented fishery product, "burong bangus". *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**(3), 193-197.
- Onyekwere O.O., Akinrele I.A., Koleose O.A. y Heys G. (1989) Industrialization of gari fermentation. En: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 363-410.
- Östling C.E. y Lindgren S.E. (1993) Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 18-24.

Oura E., Suomalainen y Viskari R. (1982) Breadmaking. En: *Fermented Foods* A.H. Rose (Ed.). Economic Microbiology, Vol. 7. Academic Press, Londres, pp 87-146.

Oyewole O.B. y Odunfa S.A. (1990) Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 145-152.

Oyewole O.B. (1990) Optimization of cassava fermentation for fufu production: effects of single starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 49-54.

Pederson C.S. (1983) Acid-fermented vegetables, historical perspectives of the literature. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 99-102.

Pflugfelder R.L., Rooney L.W. y Waniska, R.D. (1988) Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chemistry* **65**(3), 262-266.

Pompeyo C., Suárez Gómez M., Gasparian S. y Morlon-Guyot J. (1993) Comparison of amyolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**, 266-269.

Poolman B. (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 125-148.

Ramakrishnan C.V., Purushothaman D., Dhanapal N. y Rangaswami G. (1983) Indian idli, dosa (dosai) (puda), dhokla, khaman, and related fermentations. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 132-146.

Ramírez J.F. (1987) *Biochemical studies on a Mexican fermented corn food--pozol*. PhD thesis, Faculty of the Graduate School, Cornell University, N. York, 176 pp.

Robelo C.A. (1904) *Diccionario de Aztequismos, o sea, Catálogo de las palabras del idioma nahuatl, azteca o mexicano, introducidas al idioma castellano bajo diversas formas*. Imprenta del autor, México.

Robelo C.A.. (1948) *Diccionario de Aztequismos*. Ediciones Fuente Cultural, México.

Salinas Ch.C. (1958) *Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol*. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63 pp.

Salinas Ch. C. y Herrera T. (1974) Aislamiento de *Aerobacter aerogenes* del pozol del estado de Campeche. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **16**, 95-98.



Sánchez P.C., Tonganata Q. y Orillo C.A. (1983) Philippine puto. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 148-162.

Santamaría F.J. (1978) *Diccionario de Mejianismos*. Tercera Edición. Editorial Porrúa, México.

Scheirlinck T., Mahillon J., Joos H., Dhaese P. y Michiels F. (1989) Integration and expression of  $\alpha$ -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9), 2130-2137.

Sen S. y Chakrabarti S.L. (1984) Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *Journal of Fermentation Technology* 62(5), 407-413.

Sen S. y Chakrabarti S.L. (1986) Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes: purification and characterization. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 419-423.

Silva-Villarreal E.C. (1984) Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, 44 pp.

Simango C. y Rukure G. (1992) Survival of enteric pathogens in traditional fermented foods. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 37-40.

Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. y Holt J.G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2 Williams and Wilkins, Londres.

Stamer J.R. (1979) The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technology* 33(1), 60-65.

Steinkraus K.H. (1983) Tempe (tempeh) kedele. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 8-44.

Steinkraus K.H. (1989) Microbial interactions in fermented foods. En: *Recent Advances in Microbial Ecology*. T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R.Y. Morita y A. Uchida (Eds.). Japan Scientific Societies Press, Sendai, pp 547-552.

Taboada J., Salinas C., Ulloa M. y Herrera T. (1975) Fijación de nitrógeno en cultivos mono-específicos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum* usando distintas fuentes de carbono. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 17, 157-159.

Tornadizo E., Fresno J.M., Carballo J. y Martín-Sarmiento R. (1993) Study of Enterobacteriaceae throughout the manufacturing and ripening of hard goat's cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 240-246.

Trejo-González A., Feria-Morales A. y Wild-Altamirano C. (1982) The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation. En: *Advances in Chemical Series, No. 198, Modification of Proteins*. R.E. Feeney y J.R. Whitaker (Eds.). American Chemical Society, pp 245-263.

Trüpper H.G. (1993) The importance of physiology and taxonomy for microbial ecology. En: *Trends in Microbial Ecology*. R. Guerrero y C. Pedrós-Alió (Eds.). Spanish Society for Microbiology, Barcelona, pp 497-500.

Ulloa M. y Herrera T. (1972) Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 14, 15-24.

Ulloa M. (1974) Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 8, 17-48.

Ulloa M. y Herrera T. (1976-1982) Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 47-53. Serie Botánica, 145-163.

Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. (1983) Mexican pozol. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 226-233.

Ulloa M., Herrera T. y Lappe P. (1987) *Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México*. Serie de Investigaciones Sociales No. 16, Instituto Nacional Indigenista, México, pp 13-20.

Valderrama P. y Ramírez C. (1993) Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 63-67.

Vargas L.A. (1993a) Cultura y consumo de alimentos entre los indígenas de México. En: *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 35-37.

Vargas L.A. (1993b) La alimentación de los grupos indígenas de México. *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M.C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 39-42.

Velázquez R., Pozo C., Raimbault M. y Viniegra G. (1984) Ecología de la fermentación láctica en alimentos amiláceos. En: *Simposio Internacional: Las Fermentaciones de la Industria Alimentaria*. ONUDI/UAM-Iztapalapa, 27-29 noviembre, México, D.F.

Viniegra-González G. y Gómez J. (1984) Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures. En: *Chemical and Fuel Fermentation*. Wise (Ed.). CRC Press, Ontario, pp. 17-38.

Wood B.J.B. (1983) Traditional sourdough bread and *Lactobacillus*/yeast interactions. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinhaus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 179-185.

Woolford M.K. (1972) Some aspects of the microbiology and biochemistry of silage making. *Herbage abstracts* 42(2), 105-111.

Yildiz F. y Westhoff D. (1981) Associative growth of lactic acid bacteria in cabbage juice. *Journal of Food Science* 46, 962-963.

Yusof R.M., Morgan J.B. y Adams M.R. (1993) Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L-lactate and nisin. *Journal of Food Protection* 56(5), 414-417.

## APÉNDICE 1

### CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE LOS POZOLES DE TAPACHULA ⊗

Núm. de cepa	Morfología microscópica	Gas de glucosa	Producción de dextrana	Hidrólisis de almidón, cond. aeróbicas	Hidrólisis de almidón, cond. anaeróbicas	Género tentativo
1T	Diplococos y cadenas	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
5T	Diplococos y cadenas	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
6T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
8T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
13T	Diplococos y cadenas	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
16T	Diplococos y cadenas	+	-	-	-	<i>Leuconostoc</i>
18T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
22T	Diplococos alargados	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
23T	Diplococos y cadenas	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
25T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
27T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
49T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
60T	Cocos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
62T	Cocos alargados	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
63T	Diplococos	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
66T	Cocos alargados	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
2T	Diplococos y cadenas	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
7T	Diplococos y cadenas	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
14T	Diplococos	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
20T	Diplococos	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
30T	Diplococos	-	-	+	+	<i>Lactococcus</i>
43T	Diplococos	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
47T	Diplococos	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>

Continuación Apéndice 1

Núm. de cepa	Morfología microscópica	Gas de glucosa	Producción de dextrana	Hidrólisis de almidón, cond. aeróbicas	Hidrólisis de almidón, cond. anaeróbicas	Género tentativo
50T	Cocos	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
51T	Diplococos	-	-	+	+	<i>Lactococcus</i>
64T	Diplococos	-	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
68T	Diplococos y cadenas	-	-	+	+	<i>Lactococcus</i>
4T	Bacilos cortos	+	±	-	-	<i>Lactobacillus</i>
15T	Bacilos cortos	+	±	-	-	<i>Lactobacillus</i>
24T	Bacilos	-	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
35T	Bacilos	+	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>

Todas las cepas son Gram positivas, catalasa negativa.

⊗ Símbolos: +, reacción positiva; -, reacción negativa; ±, reacción débil.

APÉNDICE 2

CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE LOS POZOLES DE SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS®

POZOL MESTIZO							POZOL INDÍGENA						
Núm. de cepa	Morfología microscópica*	Gas de glucosa	Producción de dextrana	Hidrólisis de almidón, cond. aeróbicas	Hidrólisis de almidón, cond. anaeróbicas	Género tentativo	Núm. de cepa	Morfología microscópica*	Gas de glucosa	Producción de dextrana	Hidrólisis de almidón, cond. aeróbicas	Hidrólisis de almidón, cond. anaeróbicas	Género tentativo
4SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	9SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
5SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	12SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
6SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	13SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
7SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	14SI	Co	+	+	+	+	<i>Leuconostoc</i>
8SM	D	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	15SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
9SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	16SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
11SM	Co	+	+	-	+	<i>Leuconostoc</i>	17SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
12SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	19SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
13SM	Co	+	+	+	+	<i>Leuconostoc</i>	22SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
15SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	23SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
16SM	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>	24SI	Co	+	+	-	-	<i>Leuconostoc</i>
17SM	Co	+	±	-	-	<i>Leuconostoc</i>	25I	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
20SM	Co	+	±	-	-	<i>Leuconostoc</i>	5SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
21SM	Co	+	±	-	-	<i>Leuconostoc</i>	7SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
24SM	Co	+	±	-	-	<i>Leuconostoc</i>	8SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
14SM	D	-	±	+	+	<i>Lactococcus</i>	10SI	Co	-	±	-	-	<i>Lactococcus</i>
18SM	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>	11SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
19SM	Co	-	-	+	+	<i>Lactococcus</i>	18SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
10SM	B	+	+	-	+	<i>Lactobacillus</i>	21SI	Co	-	-	-	+	<i>Lactococcus</i>
							26SI	Co	-	-	-	-	<i>Lactococcus</i>
							3SI	T	-	-	-	-	<i>Pediococcus</i>
							4SI	T	-	-	-	-	<i>Pediococcus</i>
							6SI	T	-	-	-	-	<i>Pediococcus</i>
							20SI	T	-	-	-	-	<i>Pediococcus</i>
							25SI	T	-	-	-	-	<i>Pediococcus</i>

Todas las cepas son Gram positivas, catalasa negativa.

\* Co, cocos; D, diplococos; B, bacilos; T, tétrades.

© Símbolos: +, reacción positiva; -, reacción negativa, ±, reacción débil.

APÉNDICE 3

PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL POZOL, REALIZADAS CON EL KIT API20E\*⊗

Núm. de cepa	ON PG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
22	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
23	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
24	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
27	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
30	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
31	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
32	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
33	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
40	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
41	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
42	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
45	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
55	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-

Pruebas bioquímicas: ONPG, β-galactosidasa; ADH, arginina dihidrolasa; LDC, lisina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; CIT, citrato de Simmons; H<sub>2</sub>S, producción de ácido sulfhídrico; URE, ureasa; TDA, triptofano desaminasa; IND, indol; VP, Voges Proskauer; GEL, proteólisis de gelatina; Fermentación de: GLU, glucosa; MAN, manitol; INO, inositol; SOR, sorbitol; RHA, ramnosa; SAC, sacarosa; MEL, melibiosa; AMY, amigdalina; ARA, L(+) arabinosa; OX, citocromo oxidasa.

\*Con este sistema es posible identificar 108 géneros y 104 especies de enterobacterias.

⊗ Símbolos: +, reacción positiva; -, reacción negativa.

APÉNDICE 4

IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL POZOL, MEDIANTE EL KIT API20E

Núm. DE CEPA*	NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	MICROORGANISMO	PROBABILIDAD	TIPO DE IDENTIFICACIÓN
1	5005773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/17	Muy buena
9	1404573	<i>Citrobacter freundii</i>	1/56	Excelente
11	5015773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/12	Excelente
12	1404573	<i>Citrobacter freundii</i>	1/56	Excelente
22	1404573	<i>Citrobacter freundii</i>	1/56	Excelente
23	5307723	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	Muy buena
24	3504552	<i>Citrobacter freundii</i>	1/171	Buena
27	5307723	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	Muy buena
30	3504552	<i>Citrobacter freundii</i>	1/226	Excelente
31	5307723	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	Muy buena
32	1404533	<i>Citrobacter freundii</i>	1/226	Excelente
33	3504552	<i>Citrobacter freundii</i>	1/171	Buena
40	5044552	<i>Escherichia coli</i>	1/27	Excelente
41	5307723	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	Muy buena
42	5307723	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	Muy buena
45	5307763	<i>Serratia marcescens</i>	1/58	Excelente
55	5107723	<i>Serratia marcescens</i>	1/277	Muy buena
16	1005132	<i>Enterobacter agglomerans 4</i>	1/100	Muy buena

\* Cepas de los pozoles de San Cristóbal de las Casas; las de los pozoles de Tapachula coincidieron todas con las de *Klebsiella pneumoniae*.



## APÉNDICE 5

### CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS, AISLADAS DEL POZOL E IDENTIFICADAS POR NURADA (1988)⊗

Núm de cepa	Morfo- logía	Producción de:			Crecimiento a:			Creci- mien- to en 6.5% NaCl	Acidifi- cación leche torna- soleada	Hidrólisis de almidón	
		CO <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	dextrana	10°C	15°C	45°C			cond. aeróbicas	cond. anaeró- bicas
1	Coco	+	-	+	+	+	-	+	±	-	+
20	Cocos alarga- dos	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
9	Bacilo	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+

⊗ Símbolos: +, reacción o crecimiento positivo; -, reacción o crecimiento negativo; ±, reacción o crecimiento débil.

La cepa 20 fue identificada como *Leuconostoc sp.*; la 1 como *Leuconostoc mesenteroides* y la cepa 9 como *Lactobacillus plantarum*.

#### Identificación usando el sistema API 50 CH (Bio Mérieux)

Para la cepa 1 se obtuvo un coeficiente de similaridad de 84% con respecto al de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NCIB 8023, y de 89% con respecto al patrón de fermentación para esta especie reportado en el Manual Bergey (Sneath y col., 1986).

Para la cepa 9 se obtuvo un coeficiente de similaridad de 90% con respecto al patrón de fermentación de la cepa *Lactobacillus plantarum* NCFB 82, y de 91% con respecto al patrón reportado en el Manual Bergey (Sneath y col., 1986), para la misma especie.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO - DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS  
SUBDIRECCION DE SERVICIOS BIBLIOTECARIOS. DEPARTAMENTO DE TESIS  
RELACION TESIS DEL AÑO: 1 9 9 5

CLAVE: 00562

UNIVERSIDAD:

Página 1

Facultad: Facultad de Química  
Carrera: Doctorado en Ciencias Químicas (Química)

A U T O R

T I T U L O

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 1.-Castro Borges, Pedro               | Difusion y corrosion por iones cloruro en el concreto reforzado                      |
| 2.-Castro Romero, Telma Gloria        | Determinacion experimental de la fotolisis del dioxido de nitrogeno a la altura de l |
| 3.-Chavez Castellanos, Angel Enrique  | Estudios reologicos de soluciones diluidas de polimeros                              |
| 4.-Díaz Ballote, Luis Felipe de Jesus | Proceso de cementacion en paquete para producir enriquecimiento de aluminio y silici |
| 5.-Rojas Molina, Maria Alejandra      | Determinacion de los agentes relajantes de la musculatura lisa de la planta medicina |
| 6.-Soltero Martinez, J. Felix Armando | Relacion entre estructura y propiedades reologicas de cristales liquidos liotropicos |
| 7.-Wacher Rodarte, Maria del Carmen   | Estudios sobre la microbiologia del pozol  |