

6
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

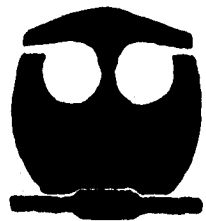
FACULTAD DE QUIMICA

**ASIMILACION DIFERENCIAL DE CARBOHIDRATOS
POR Geotrichum sp., AISLADO DE POZOL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:**

NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA



MEXICO, D.F.

1996.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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

Presidente: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero.
Vocal: Prof. María del Carmen Wachter Rodarte.
Secretario: Prof. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.
1er. Suplente: Prof. Marcos Francisco Báez Fernández.
2do Suplente: Profra. Beatriz de Guadalupe Serrano López.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

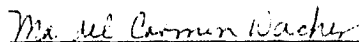
Laboratorio de Fisiología de Hongos, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



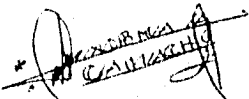
Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.

SUPERVISOR TECNICO



Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

SUSTENTANTE



Norma Angélica Camacho de la Rosa.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Rosario y Celestino.

con todo mi amor....

parte de sus esfuerzos, con este trabajo se ven recompensados.

A MIS HERMANOS

Lurdes,
por tu ejemplo.
Tere,
por tus consejos.
César,
por tu presencia.

A MIS SOBRINOS

Anaí, Gaby, Nancy, César, Tere, Rudín y Starkov.
Su compañía siempre me ha llenado de alegría.

A TODA MI LA FAMILIA.

Por que si dejara de confiar en el hombre,
en ese momento dejaria de existir yo

Emilio Rojas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio, por su asesoría en la realización de este trabajo, y por permitirme formar parte de su grupo.

A Blanca Trejo, por sus oportunos consejos en el trabajo de laboratorio y su amistad en todo momento.

A Alejandro Mancilla por su cariño.

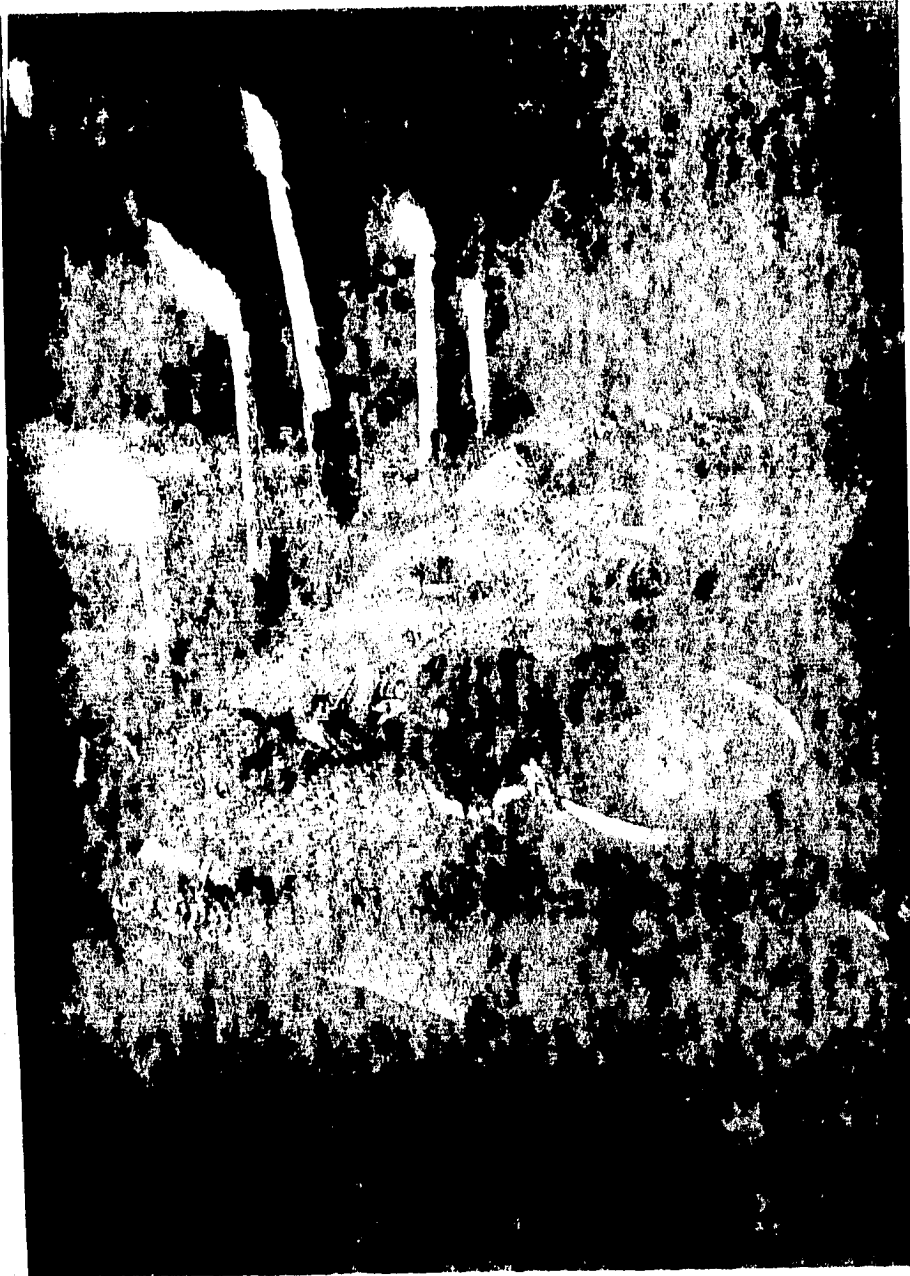
A mis compañeros de laboratorio: Angeles, Blanca Rosa, Laura, Martí, Norma, Ricardo, Sara, Maru, Leo, Mao, Alfredo y en especial a Luis Delgado por su gran ayuda en el laboratorio.

A mis grandes amigos: Analey, Carmen, Olivia, Martín, gracias por compartir tantos momentos; aunque la vida nos ha conducido por caminos diferentes, espero que siga conservando su amistad.

A mis amigos y compañeros de la Facultad: Yara, Lulú, Sofía, Artemisa, Lety, Salvador, Ricardo; por compartir momentos inolvidables en esta gran escuela. También a Fernando, Gaby, etc.

A la Generación Alimentos 89.

Este trabajo se realizó con Apoyo del Programa 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química y con el Apoyo de Proyecto De la Dirección General de Personal Académico (DGAPA) con el Proyecto IN210194.



Pozol. Bebida refrescante que se prepara con maiz nixtamalizado y fermentado. Forma parte en las ofrendas para la roza, tumba y quema de la milpa. Es tradicional de los estados del sureste del país.

Fuente: Foto. Guía México Desconocido. 1994. Bebidas Nacionales. Edición Núm. 18.
Editorial Jilguero, S. A de C.V.

CONTENIDO

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Antecedentes.....	4
IV. Objetivos.....	28
V. Materiales y Métodos.....	29
VI. Resultados y Discusión.....	35
VII. Conclusiones.....	56
VII. Bibliografía.....	58

RESUMEN

Durante la fermentación del pozol se desarrollan varias especies de bacterias, levaduras y mohos. Se ha observado que *Geotrichum candidum* se desarrolla frecuentemente en la masa de pozol y su presencia coincide con la aparición de olores frutales agradables. Debido a la complejidad del sistema de fermentación, fue necesario desarrollar un modelo experimental de acuerdo a la composición de la masa nixtamalizada que permitiera estudiar el comportamiento de una cepa de *Geotrichum* aislado de pozol. El crecimiento y consumo de mono y disacáridos de *Geotrichum* se favorece a valores de pH ácidos. Por otro lado, la presencia del aceite de maíz como fuente de carbono alternativa estimula el crecimiento de *Geotrichum* pero no modifica el consumo de monosacáridos. En el caso de los disacáridos la presencia de aceite de maíz estimula el crecimiento y consumo de los mismos. *Geotrichum* es incapaz de crecer en almidón como única fuente de carbono y la adición de aceite de maíz no favorece su consumo, ya que el crecimiento obtenido con ambas fuentes de carbono es igual al obtenido con almidón solo. Asimismo, el ácido láctico representa una buena fuente de carbono para el crecimiento del hongo y al utilizarlo conjuntamente con carbohidratos el consumo de estos se favorece y el crecimiento es mayor que en cada uno de ellos por separado. Al igual que con aceite de maíz, la adición del ácido láctico al medio con almidón no mejora el crecimiento; mientras que *Geotrichum* crece bien en ácido láctico solo. En medio que contienen masa nixtamalizada, el crecimiento fue pobre y la adición de aceite de maíz y ácido láctico no estimulan el crecimiento. Es aparente de acuerdo a los resultados obtenidos, que *Geotrichum* utiliza medianamente los monosacáridos, pobremente los disacáridos y que es incapaz de utilizar almidón como fuente de carbono. Puede utilizar eficientemente ácido láctico y el aceite de maíz. Esto supone que el crecimiento de *Geotrichum* durante la fermentación del pozol, se inicia utilizando el aceite de maíz presente en la masa y se acelera una vez que las bacterias lácticas producen el ácido láctico y modifican el pH.

INTRODUCCION

El maíz cuyo cultivo debe haberse iniciado hace aproximadamente 700 años, constituye inmediatamente después del arroz y del trigo, la tercera cosecha más importante de cereales en el mundo y ha sido uno de los principales alimentos de los habitantes de las zonas rurales de México y otros países de Latinoamérica. En México existen numerosos grupos indígenas, muchos de los cuales desde épocas prehispánicas han consumido diversos alimentos y bebidas fermentadas (Ulloa, M., 1979). Existe una infinidad de alimentos que se preparan con este cereal, entre los que destacan los alimentos fermentados de maíz, con fines no únicamente nutricionales, sino además son empleados en sus rituales religiosos y otras veces con fines medicinales. Por lo que cada cultura esta íntimamente relacionada a ciertos alimentos que forman la base de su dieta y cultura (Cañas, 1993). Entre estos encontramos al pozol, es una bebida refrescante que se consume en el sureste de nuestro país. Se elabora apartir de masa de maíz nixtamalizada, formándose bolas de diferentes tamaños, las cuales se envuelven en hojas de plátano y se dejan fermentar. Durante su fermentación se desarrollan bacterias, hongos y levaduras. Sin embargo no se conoce cual es la dinámica con la que evolucionan estas diferentes poblaciones, ni las interacciones que se llevan a cabo entre ellas. El moho que se encuentra más comúnmente en el pozol es *Geotrichum candidum*, su crecimiento blanco algodonoso se puede observar en la superficie de las masas en fermentación y su presencia coincide con la aparición de olores frutales agradables, se ha propuesto que estos aromas son el resultado de la degradación de los lípidos del maíz por el hongo ya que este género se caracteriza por presentar una actividad lipolítica importante.

Por otro lado, se ha encontrado que el crecimiento de *G. candidum* se favorece a pHs ácidos, consume el ácido láctico y los lactatos, es por esta razón que se piensa que la sucesión microbiana se da por la aparición de metabolitos producidos por microorganismos antecesores y esto influye sobre el consumo de los nutrientes intrínsecos de la masa (carbohidratos, lípidos y proteínas), susceptibles de ser consumidos por el moho.

La fermentación del pozol se lleva a cabo en estado sólido que se da de manera espontánea, por lo que es un sistema complejo para su estudio, por lo que se hizo necesario desarrollar un modelo experimental de acuerdo a la composición salina de la masa nixtamalizada que permitiera determinar la manera precisa en que *Geotrichum* sp. aprovecha los carbohidratos presentes en este sustrato como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y almidón; así como el efecto que el aceite de maíz tiene sobre el crecimiento de *Geotrichum* y el consumo de los carbohidratos.

Como ya se mencionó, en el transcurso de la fermentación se desarrolla una microbiota compleja compuesta por diferentes grupos de microorganismos (Wacher, 1993). Entre los microorganismos que se desarrollan se ha postulado que las bacterias lácticas al producir el ácido láctico con la consecuente disminución del pH, podrían estimular el crecimiento de otros grupos de microorganismos, esto supone que entre las bacterias lácticas que se desarrollan en la masa y el moho *G. candidum* haya simbiosis, por lo que también se determinó el efecto que el ácido láctico tiene en el crecimiento y consumo de los carbohidratos.

ANTECEDENTES

Composición Química del maíz.

El grano de maíz está formado principalmente por carbohidratos, formando aproximadamente el 83% de su materia seca (Catalal, 1971), por lo que se le considera una fuente de energía. Contiene además proteínas, grasas, vitaminas y minerales entre otros.

Tabla 1. Composición Química del Maíz.

Componente	%
Materia Seca	85
Proteína Cruda	8.9
Grasa Cruda	4.5
Carbohidratos	2.9
Calcio	0.01
Fosfatos	0.25

Fuente: Allen, 1981.

Los carbohidratos se encuentran distribuidos principalmente en el embrión y en el endospermo, el primero contiene más o menos las dos terceras partes del total de azúcares y el segundo el resto (Watson, 1987). Dichos azúcares están representados por: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y polisacáridos (almidón, celulosa, hemicelulosa).

Los monosacáridos son los azúcares más sencillos, los cuales se encuentran en una porción sumamente baja (Tabla 2). Los más importantes son: la D-glucosa y la D-fructosa (Sosa, 1970). Estos son solubles en agua y sus soluciones tienen un sabor dulce, ambos son azúcares reductores (Badui, 1989). Existen otros monosacáridos que generalmente están asociados a nucleótidos como: UDP-glucosa, UDP-galactosa, pero están en tan bajas cantidades que no se toman en cuenta (Fennema, 1985).

Entre los disacáridos encontramos por un lado a la sacarosa y por el otro a la maltosa. La sacarosa está formada por la unión de una molécula de glucosa y una de fructosa.

es un azúcar no reductor, ya que no cuenta con un grupo carbonilo libre reactivo, mientras que la maltosa esta constituida por dos moleculas de glucosa unidas por un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$, por tanto es un azúcar reductor. se encuentra en cantidades más bajas con respecto a la sacarosa (Tabla 2). Se ha observado que la proporción de maltosa aumenta a los dos o cuatro días de iniciada la germinación (Sosa, 1970).

Dentro de los carbohidratos los trisacáridos son los que se encuentran en menor cantidad en los granos de maíz, y de ellos, la rafinosa, constituida por D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, es la más importante (Sosa, 1970).

Tabla 2. Contenido de Carbohidratos en granos de Maíz.

Carbohidrato	%
Monosacáridos	
D-Fructosa	0.1-0.4
D-Glucosa	0.2-0.5
Disacáridos	
Sacarosa	1.0-2.0
Maltosa	0.4
Trisacáridos	
Rafinosa	0.1-0.3
Polisacáridos	
Almidón	68.0-78.0
Dextrinas	--
Pentosanas	6
Hemicelulosas	5-6
Celulosa	1.0

Fuente: Fennema, 1985.

El almidón es el componente mayoritario en los granos de maíz, constituye del 68-78% de su endospermo. Es un polímero de la glucosa con uniones alfa en su mayor parte en las posiciones 1-4 y algunas en la posición 1-6 (Fennema, 1985). Se encuentra en dos formas: amilosa de cadena lineal y amilopectina de cadena ramificada. El almidón absorbe agua a través de sus zonas amorfas, según la especie y las proporciones de amilosa y amilopectina. El gránulo en agua se hincha y aumenta ligeramente de

tamaño. cuando se incrementa la temperatura la retención de agua también aumenta. La temperatura a la cual se produce el máximo hinchamiento se llama temperatura de gelatinización. La temperatura de gelatinización en el almidón de maíz es de 62-70°C (Badui, 1989).

Entre los polisacáridos encontramos también a la celulosa, la cual se encuentra en mayor proporción en el pericarpio, es un polisacárido de cadena lineal, formado por unidades de D-glucosa en uniones $\beta(1-4)$, formando lo que se llama "fibra cruda" (Badui, 1989), mientras que la hemicelulosa, también conocida como pentosana y metilpentosana, se encuentra en una proporción de 5-6%.

Por otro lado el contenido de grasa aumenta durante el periodo de maduración llegando a una proporción del 4.5-4.8% en el grano maduro, siendo los tejidos del embrión los que contienen más grasa, aproximadamente el 84% del total.

El maíz contiene del 8 al 6% de proteína y esta se encuentra en el endospermo, contiene bajas cantidades de aminoácidos esenciales tales como: lisina y triptófano. por lo que se considera proteína de baja calidad, ya que no produce resultados eficientes en la alimentación (Sosa, 1970). (Tabla 1).

En el maíz las vitaminas están localizadas esencialmente en el embrión y la capa exterior del endospermo donde se encuentra la aleurona (Tabla 3).

Tabla 3 Contenido de Vitaminas en los granos de Maíz (μg por gramo).

Vitamina B1	4.5
Rivoflavina (B2)	0.6
Acido Nicotínico	53
Acido Pantoténico	17
Biotina	-
Piridoxina (B6)	10.3

Fuente: Sosa, 1970.

El 95% del material mineral de los granos de maíz está formado por fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. Además cuenta con minerales tales como: hierro, aluminio, sodio y cloro, presentándose en mínimas cantidades. La Tabla 4 indica la composición mineral de los granos de maíz.

Tabla 4. Minerales en los Granos de Maíz (mg por 100 g de materia seca).

Elementos	
Mayores	
K	339
P	322
S	151
Mg	121
Cl	45
Ca	29
Na	26
Menores	
Fe	3.6
Zn	-
Mn	0.7
Cu	0.5
Trazas	
I	0.036

Fuente: Fennema, 1985.

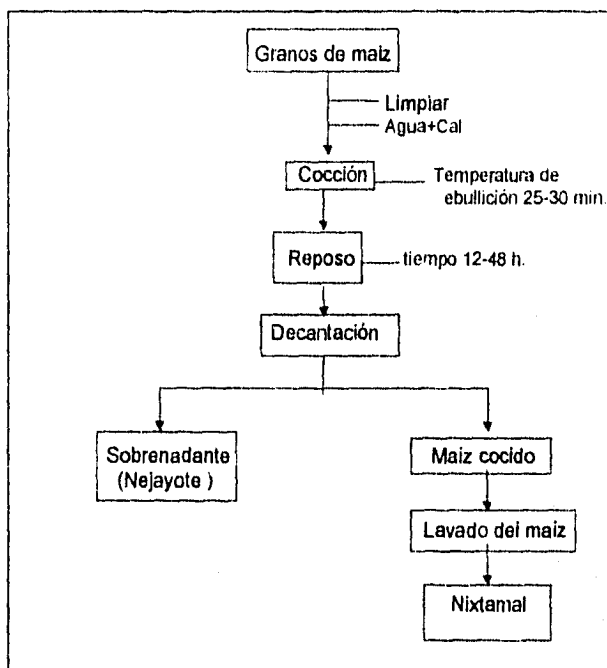
Nixtamalización del Maíz.

El proceso fundamental en la elaboración de masa para tortillas y algunos otros alimentos de maíz, como el pozol es la "nixtamalización", palabra nahuatl derivada de *nextli* que significa cenizas de cal y *tamalli* que significa masa de maíz, este es un proceso térmico-alkalino, en donde los granos de maíz se ponen a cocer con agua y cal (1-3%) de 25-30 minutos, seguido de un reposo de 12-24 horas, después los granos se lavan y se muelen obteniéndose la masa nixtamalizada (Figura 1).

Durante el proceso se desprende la cáscara y se suaviza el grano perdiendo una cantidad importante de fibra cruda (Rodríguez, 1978). Esto resulta del efecto conjunto temperatura-cal, que actúan provocando una gelatinización parcial del almidón.

También ocurren varios cambios químicos, entre estos destaca el aumento en la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales como: lisina, treonina, histamina, metionina y triptófano. Esto se debe a que el calcio interacciona con los enlaces disulfuro de cistina de la fracción proteica gluteína del grano, provocando que el complejo se abra y deje disponibles a los aminoácidos (González, 1991).

Figura 1. Diagrama de la Nixtamalización del Maíz.



Fuente: Canas, 1993.

Otro cambio que resulta importante es la liberación de vitaminas que se encuentran formando parte de un complejo que resulta difícil de atacar por las enzimas digestivas, de entre las que encontramos a la niacina. El consumo de alimentos nixtamalizados por

el aumento en la disponibilidad de la niacina, trae como consecuencia la aparente ausencia de pelagra en México (Badui, 1989).

Finalmente se muestra la tabla de algunos alimentos de maíz, en donde se observa como varia la composición dependiendo del proceso al cual se han sometido los diferentes productos de maíz.

Tabla 5. Composición de Alimentos Mexicanos de Maíz.

Alimentos	Proteínas g	Grasas g	CHOS g	Calcio mg	Hierro mg	Tiamina mg	Riboflavina mg	Niacina mg	Ac.Ascor mg	Retinol mcgEg
Maíz amarillo	8.3	4.8	69.6	158	2.3	0.34	0.08	1.6	0	17
Maíz blanco	7.9	4.7	73	159	2.3	0.36	0.06	1.9	0	1
Harina nixtamalizada	7.1	4.5	77.4	140	3.9	0.22	0.05	1.3	0	1
Harina sin cal	8.2	5.1	78.8	35	2.6	0.26	0.05	1.7	0	1
Masa	4.4	2.3	38.5	88	1.7	0.17	0.05	0.8	0	0
Masa de Yucatán	4.6	1.2	36.4	90	2.0	0.09	0.03	0.7	0	0

Fuente: Tabla Valor Nutritivo de Alimentos Mexicanos, 1980.

Pozol.

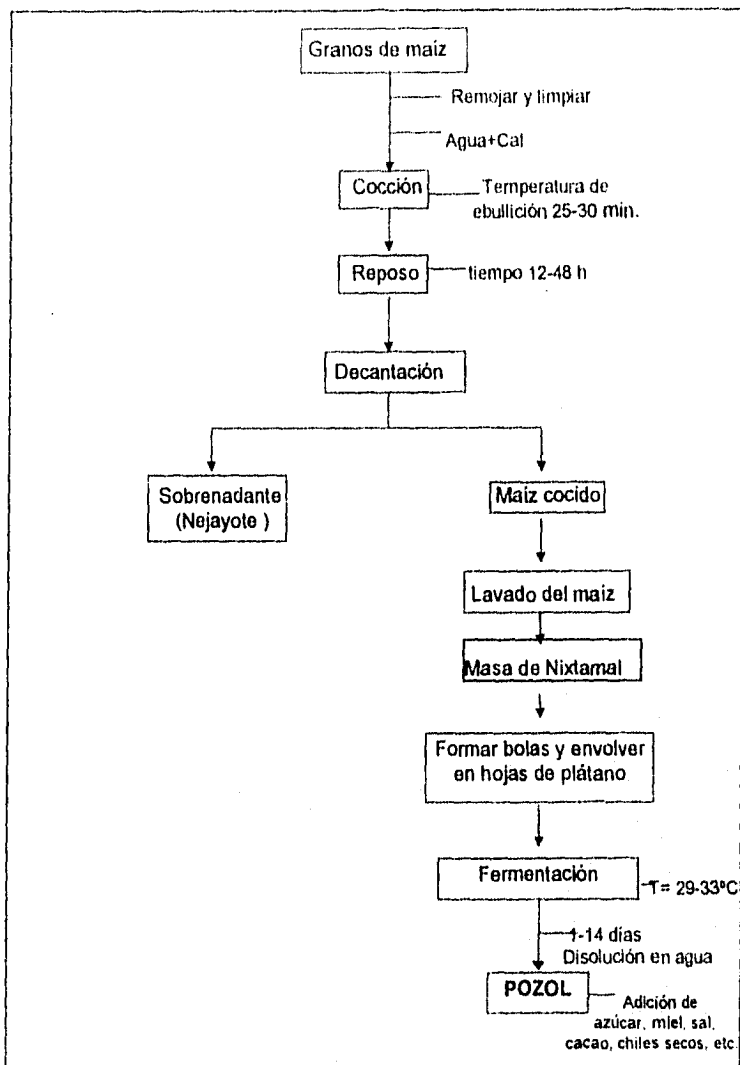
Como ya se mencionó, al maíz se le ha asociado una parte importante en los rituales religiosos, en los mitos sobre el origen de la vida y en otros elementos de la cultura. Entonces, resulta lógico pensar que algunos de los alimentos fermentados de nuestro país se preparen a base de maíz. Entre los cuales encontramos al pozol (Cañas, 1993). El pozol del nahuatl *pozolli*, que significa espumoso, es una bebida refrescante de origen maya, preparada a partir de masa de nixtamal fermentada. Es consumido por los mestizos y grupos étnicos del sur y sureste de México, tales como chontales y choles de Tabasco, mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, lacandones, tzotziles o

chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas y zapotecos de Oaxaca (Ulloa, M., 1979).

Para elaborar pozol, el maíz se limpia agregándole agua, dejándolo reposar y quitándole la materia extraña, así como los granos podridos, se decanta el agua. Enseguida se le adiciona agua y cal, se pone al fuego y se deja hervir de hora a hora y media, se retira del fuego cuando la cascarilla se quita fácilmente, se deja reposar de 12-24 horas. Después los granos de maíz se lavan frotándolos con las manos y enjuagándolos varias veces con agua para eliminar la cal y el hollejo. Se ponen a escurrir obteniéndose el nixtamal. El nixtamal es molido en un metate o en un pequeño molino de mano para obtener la masa (Aguilera, 1981). La masa se moldea formando bolas que se envuelven en hojas de plátano (*Musa spp.*), de platanillo (*Heliconia spp.*) o de hoja blanca (*Calathea lutea*) con el fin de disminuir la pérdida de agua de la masa, durante el tiempo que dura la fermentación. El tiempo de fermentación varía entre uno a cinco días. Sin embargo, algunos grupos indígenas como los lacandones y chamulas lo dejan fermentar de dos a tres semanas consumiéndolo ya enmohecido (Ulloa, M., 1979). Por último a la masa ya fermentada se le suspende en agua, quedando lista para consumirse.

Por otro lado, en algunos lugares de Tabasco y Chiapas, el pozol se prepara con un aroma especial, al cual le añaden la planta "insular" o "isaúl" en el agua en que se bate la masa, en Oaxaca este, se conoce como "pozonque", mientras que en Tabasco, existe una modalidad llamada "chorote" al que le añaden semillas de cacao molidas a la masa nixtamalizada antes de que fermente. En la región de Chinantla, Oaxaca, agregan a la bebida cacao tostado y molido con cenizas de carbón de encino, en la región mixe le añaden "cocolmecat" (bejuco silvestre y cacao molidos), y en Yucatán suelen agregarle coco (Wacher, 1993). Otros grupos le adicionan sal, azúcar, miel o chiles secos una vez que se ha diluido la masa en el agua (Ulloa, M., 1974).

Figura 2. Diagrama de Elaboración del Pozol.



Fuente: Canas, 1993. Ulloa, 1979.

El pozol es preparado en forma doméstica, en pequeñas cantidades para la familia que lo elabora o también en mayor cantidad, para ser vendido. Uno de los lugares donde se

puede encontrar pozol comercial es en San Cristóbal de las Casas, cabecera y centro integrador de la zona Altos, donde existen dos diferentes productores que lo comercializan: los indígenas y los ladinos o mestizos (Cañas, 1993). La manera de elaborar el pozol varía entre estos dos grupos. Cañas reporta que en la elaboración del pozol ladino hay una segunda cocción o "reventado", esta operación representa la diferencia más importante entre el pozol ladino y el pozol indígena. Al reventar el nixtamal previamente a la molienda da como resultado un pozol más terso, menos oscuro, que los indígenas consideran que no sirve, mientras en el pozol indígena que no es reventado se obtiene un "sedimento chicloso", que es el material fibroso del grano. (chincastiti) que no es del agrado del consumidor mestizo (Cañas, 1993).

Estudios Bioquímicos del Pozol.

Tomando en cuenta la importancia de esta bebida, se han realizado estudios científicos sobre el pozol. En 1945 Cravioto y cols. (Alvarez, 1991) realizaron un análisis químico comparativo entre el pozol y los granos de maíz, y encontraron un aumento en el contenido proteico del pozol, ya que los aminoácidos como lisina, y triptófano aumentaban, así como ciertas vitaminas entre ellas la niacina y la rivotravina, aunque el contenido de tiamina, fibra cruda y fósforo era menor. También observaron un mayor aumento de peso en ratas blancas alimentadas con pozol que con los granos de maíz únicamente. Comentaron en su trabajo la necesidad de iniciar estudios microbiológicos sobre el pozol, ya que el aumento en la disponibilidad de proteínas se debía al desarrollo de microorganismos, algunos de los cuales podían ser observados a simple vista en la masa fermentada.

Mediante otros estudios se ha corroborado el incremento de proteína durante la fermentación del pozol. En 1987 Aguilera y cols. reportaron el incremento de proteína cruda, como proteína soluble durante la fermentación.

Estudios Microbiológicos del Pozol.

La mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se destruyen durante la nixtamalización y es probable que después de este proceso la masa sea inoculada

por la manipulación de las personas que lo suelen preparar debido a la falta de higiene y a su exposición al ambiente. Sin embargo hay varias especies de bacterias, levaduras y mohos que son constantes en pozoles de diferentes lugares (Alvarez, 1991). Los primeros estudios microbiológicos fueron realizados por Salinas en 1958, quien reportó dos especies de bacterias: *Bacillus cereus* y *Paracolobactrium aerogenoides*. Así mismo se han encontrado levaduras del género *Candida*, así como *Trichosporum cutaneum* y *Geotrichum candidum*. Estos microorganismos se presentan en etapas tempranas de la fermentación del pozol en tanto que mohos como *Cladispourum cladosporoides*, *Cl. herbarum*, *Monila sitophila* y *Mucoroxianus* aparecen en etapas posteriores cuando el pH a disminuido y la superficie se va secando. También es común encontrar *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum spp*, *Fusarium spp*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viridae*, *Penicillium claviforme*, *P. cylobium*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. lanoso-viridae* y *Phialophora* (Ulloa, 1974), además de *B. cereus*, *Aspergillus flavus*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Phialophora richardsiae* especies patógenas o potencialmente patógenas del hombre (Ulloa y cols , 1983). También se han aislado bacterias fijadoras de nitrógeno como: *Agrobacterium azotophilum* y *Klebsiella*. Otros estudios demostraron que *Acromobacter pozolis* (Ulloa,1972) presenta fenómenos antagónicos con otros microorganismos presentes en el pozol.

En estudios posteriores se ha encontrado que durante las primeras horas se desarrollan las bacterias superando en número a las levaduras y mohos y son probablemente, las responsables de la mayoría de los ácidos orgánicos producidos. Por análisis cromatográfico se ha determinado que en el pozol se lleva a cabo una fermentación combinada láctica-acética-alcohol-butírica (Aguilera, 1987). Aunque la fermentación del tipo láctica es la que predomina (Wacher, 1995). En la Tabla 6 se presenta un resumen de los microorganismos que se han aislado de pozol.

Tabla 6. Microorganismos aislados de Pozol.

Bacterias	Mohos
<i>Achromobacter pozolis</i>	<i>Alternaria tenuis</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Agrobacterium azotophilum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Escherichia coli var neopolitana</i>	<i>Epicocum sp.</i>
<i>Paracolobactrum aerogenoides</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Pseudomonas mexicana</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Monilia sitophila</i>
<i>Lactococcus sp.</i>	<i>Mucor racemosus</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Mucor rouxianus</i>
<i>Pediococcus sp.</i>	<i>Penicillium claviforme</i>
	<i>Penicillium cyclopium</i>
	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Penicillium italicum</i>
	<i>Penicillium lanoso-viride</i>
	<i>Phielophora richardsiae</i>
	<i>Rhizopus nigricans</i>
	<i>Trichoderma viride</i>
Levaduras	
<i>Candida quilliermondii</i>	
<i>Candida krusei</i>	
<i>Candida parapsilopsis</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Hansenula fabiani</i>	
<i>Kluveromyces fragilis</i>	
<i>S. cerevisiae</i>	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	

Fuente: Ullo y cols., 1987.

Alimentos Fermentados de Maíz elaborados en México.

En México, además del pozol existen otros alimentos fermentados de maíz de carácter regional, que forman parte fundamental en la dieta de los grupos étnicos que los elaboran. El tescüino del nahuatl *tecuin*, palpitar del corazón (México Desconocido, 1994) es también llamado tejuino o batari, es una bebida alcohólica semejante a la cerveza, se prepara a partir de granos de maíz, los cuales son germinados en un lecho de hojas de pino, se cubren con ramas y se humedecen hasta que germinan. Después de molerlos y hervirlos, el líquido se cuele y desposita en ollas para que fermente, se acostumbra agregar una gramínea para que se acelere su fermentación. El producto no es filtrado, por lo que contiene tanto los microorganismos causantes de la

fermentación, como las sustancias que se producen, consecuencia del metabolismo de los mismos, es de sabor amargo y de bajo contenido alcohólico. Esta bebida es consumida principalmente por grupos indígenas del norte y noreste de México, tales como los yaquis, pápagos y pimas de Sonora, los tarahumaras de Chihuahua, los tepehuanos de Durango y los huicholes de Nayarit y Jalisco, quienes lo toman en fiestas y danzas; en los rituales y en la ceremonias.

En la Tabla 7 se mencionan otros alimentos fermentados tradicionales, cuyo sustrato es el maíz. la mayoría son líquidos, a diferencia del pozol cuya fermentación se lleva a cabo en estado sólido.

Otros Alimentos Fermentados de Maíz.

En lugares como Africa, también se elaboran diversos alimentos fermentados a base de maíz. Para la elaboración de estos se siguen diferentes procedimientos, en ninguno de estos productos se utiliza maíz sometido a nixtamalización. Entre estos alimentos se encuentran el: *Ogi*, *Kenkey*, *Banku*, *Abele*, *Uji*, *Mahewu* y *Koko* (Loeza, 1990). El *Ogi* es de origen africano, también se le adiciona sorgo y mijo. Durante su elaboración tradicional se ha observado que su valor nutritivo disminuye, por lo en el proceso industrial a los granos de maíz se les enriquece adicionándoles lisina, de esta manera se desarrollan *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis* y *Saccharomyces rouxii* entre otros microorganismos (Wood, 1985).

El *Kenkey* originario de Ghana, es una bola de masa de maíz fermentada, tiene un valor nutritivo mayor que otros alimentos fermentados. Durante la fermentación se incrementa la tiamina, la riboflavina y la proteína por la actividad microbiana. Se ha observado que al inicio de la fermentación predominan especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, pero disminuyen rápidamente. Las bacterias lácticas se desarrollan velozmente después de las 9 h de fermentación, predominando entre las 24 y 36 horas. Estas bacterias junto con las levaduras constituyen la microflora predominante en la última fase de la fermentación (Wood, 1985).

Tabla 7. Alimentos Fermentados a Base de Maíz, elaborados en México.

Nombre	Características	Estado
Agua agria	Bebida no embriagante preparada con maíz molido mezclado con agua.	San Luis Potosi, Hidalgo, Guerrero, D. F., Tlaxcala, Jalisco Michoacán.
Atole	Bebida no embriagante preparada con granos de maíz molidos y tostados o con tortillas y escobajos de mazorcas quemadas y molidas.	Abarca los mismos Estados que Agua agria.
Atole agrio	Bebida no embriagante preparada con masa agria mezclada con maíz blando, la masa agria se prepara con maíz negro fermentado durante 5 días.	Abarca los mismos Estados que agua agria.
Chicha	Licor que se obtiene de la caña de maíz, cuando la mazorca esta en leche.	Principalmente en el estado de Chiapas.
Cuarapa	Bebida embriagante preparada con zumo de caña de maíz.	Puebla: Tehuacán
Chilatole	Bebida de maíz fermentado con chile y sal.	Puebla y Tlaxcala.
Charagua	Bebida no embriagante, a base de pulque rezagado, con aimbar, chile y hojas de maíz tostadas.	Abarca los mismos Estados que Agua agria.
Ostoché	Bebida embriagante, elaborada a base de jugo de caña de maíz y pulque o panocha.	Estado de México.
Quebranta huesos	Bebida embriagante elaborada con zumo de caña de maíz verde y maíz verde tostado machacado con jugo de pirú.	Guanajuato.
Sedencho	Especie de cerveza elaborada a base de maíz germinado.	Estado de México.
Tequino	Se produce por añejamiento del maíz, ocasionalmente se acompaña de limón y bicarbonato.	Bebida típica de estado de Aguascalientes.
Tesquino	Elaborado base de maíz recién nacido, molido y fermentado.	Propio de la región de Jalisco.
Tepache	Bebida embriagante elaborada con granos de maíz y piloncillo o panela.	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas.
Vino de caña	Bebida embriagante preparada con infusión de caña de maíz molido.	Estado de México y Morelos.

Fuente: Loeza 1990, tomada de Ulloa, 1973. México Desconocido, 1994.

El *Koko* elaborado en Ghana es preparado de la misma manera que el *Ogi*, aunque en este caso no se reporta ningún incremento nutritivo, la población microbiana esta constituida por bacterias homofermentativas como *Pediococcus cerevisiae* y microorganismos heterofermentativos: *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc fermenti* (Brian, 1985).

El *Uji* es un alimento de maiz agrio consumido principalmente en Kenia, es un producto cremoso. La fermentación espontanea de *Uji* se caracteriza por el crecimiento secuencial de microorganismos dominantes, al inicio crecen rápidamente los coliformes pero después son rebasados por las bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus plantarum*, *L. cellobiosus* y *L. buchneri* lo que restringe el crecimiento y sobrevivencia de los primeros. Algunas poblaciones consideran que el consumo de *Uji* estimula la producción de leche en las madres que amamantan a sus bebés (Loeza, 1990). El *Mahewu* también es similar al *Ogi*, es tomado por los *Bantus* del sur de Africa, su calidad proteica es pobre, con la fermentación el contenido de tiamina disminuye, la riboflavina permanece constante, únicamente el contenido de niacina disponible se duplica. El microorganismo nativo de este alimento es *Streptococcus lactis*, se han hecho estudios para incorporar a la fermentación en gran escala algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus delbrueckii* y *L. bulgari* para aumentar su aceptación por los consumidores, ya que mejoran el sabor y textura del producto. El *Ogi* difiere del *Uji*, del *Mahewu* y de otros alimentos fermentados, en que el primero es de pasta fina mientras que los otros son de pasta firme y granulosa.

Interacciones entre microorganismos.

Es común observar que durante la fermentación de los alimentos antes mencionados y en muchos otros, se desarrollen diferentes grupos de microorganismos, los cuales contribuyen a las características finales de cada producto. A lo largo de su fermentación determinados microorganismos desaparecen, como en el caso de *Uji*, otros se mantienen en un nivel constante, mientras otros se multiplican abundantemente. Esta evolución puede ser la consecuencia de variaciones en las

características del medio, variaciones de pH, del contenido de sales, del Aw, de la disponibilidad de nutrientes, etc. (Capparelli, 1975). Asimismo los fenómenos metabólicos ligados al desarrollo de los microorganismos determinan la aparición en el medio de compuestos favorables o inhibidores del crecimiento de diferentes grupos de microorganismos. Este fenómeno se le denomina sintrofia (Eck, 1990). En muchos alimentos fermentados se han descrito las múltiples asociaciones microbianas que se dan para obtener el producto final.

En el pozol se han empezado a estudiar las posibles interacciones que se dan entre los microorganismos que se desarrollan. Giles, (1995) estudió las relaciones de las bacterias lácticas con las bacterias fijadoras de nitrógeno y su posible asociación en el incremento de proteína, que en pozoles tradicionales se produce, encontró que efectivamente se desarrollan bacterias fijadoras de nitrógeno en masa nixtamalizada, pero la asociación bacteria láctica-bacteria fijadora de nitrógeno no necesariamente produce un incremento en la proteína soluble del pozol. Por lo que menciona que además de esta asociación, en el pozol deben de llevarse a cabo otras asociaciones microbianas que producen un incremento en la proteína.

Por lo que se refiere a *Geotrichum candidum* en interacciones microbianas se ha encontrado que en la elaboración del gari, alimento fermentado de yuca, el crecimiento de esta especie se estimula por la presencia de ácidos orgánicos y la consecuente disminución del pH, debido a la acción de microorganismos que se desarrollan en las primeras horas antes que *Geotrichum candidum* (Brian, 1985).

Geotrichum candidum.

El moho que se encuentra más frecuentemente en el pozol y en otras fermentaciones de maíz es *Geotrichum candidum*, su crecimiento blanco se puede observar en la superficie de las masas en fermentación donde su presencia coincide con la aparición de olores frutales agradables. Está frecuentemente asociado a productos lácteos por lo que le llaman a menudo "hongo de las lecherías" (Eck, 1990).

Causa alteraciones en algunas frutas y verduras, provocando la podredumbre blanda acuosa o más conocida por podredumbre oospora (Frazier, 1985), pero en otros su presencia es deseable como en la maduración de algunos quesos y durante la fermentación del gari, así como de kefir y posiblemente del pozol.

G. candidum, pertenece a la división Amastigocycota, subdivisión Deuteromycetes también llamada grupo de los hongos imperfectos, se les llama así porque aparentemente carecen de fase sexual ó "fase sexuada" (Moore-Landecker, 1990), pero ocasionalmente se puede reproducir sexualmente (estado perfecto o teleomorfo), ya que a *G. candidum* se le considera la forma imperfecta de la levadura *Endomyces*. Por lo que se le ha considerado el punto intermedio entre los hongos filamentosos y las levaduras.

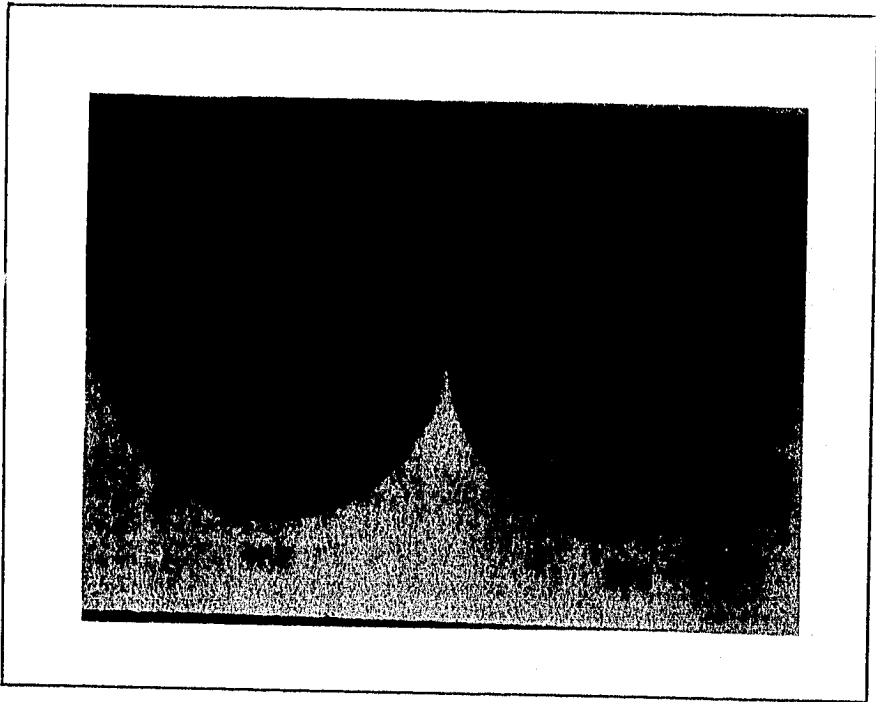
En la Figura 3 se pueden observar las características de las colonias de las cepas de *Geotrichum* aisladas de pozol, los medios de PDA y GELP. Las colonias son blancas y amarillentas, inicialmente su crecimiento se presenta como una masa firme con aspecto de fieltro y posteriormente se torna blanda y cremosa.

Características Morfológicas.

Se caracteriza morfológicamente por la presencia de artrosporas u oidias, que resultan de la fragmentación de las hifas, estas son las ramificaciones del micelio. En ciertas condiciones *G. candidum* produce lo que en otros microorganismos serían las esporas, que son llamadas por su forma cilíndrica falsas levaduras (Duran y col., 1973).

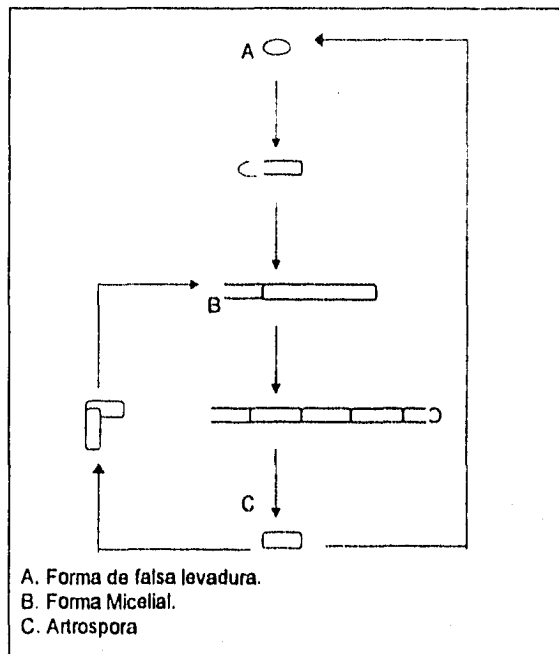
Las falsas levaduras muestran una ultraestructura similar a las esporas fungales, que resisten al ataque por enzimas liticas (Duran y col., 1973).

Figura 3 Características morfológicas de cepas de *Geotrichum candidum* en medios de PD y GELP.



Las artrosporas tienen forma cilíndrica con extremos redondeados, la formación de estas estructuras se ve modificada bajo ciertas condiciones, por ejemplo: a ciertas concentraciones de glucosa, a bajos valores de pH, etc. (Figura 4), (Kier, 1976).

Figura 4. Diversas Estructuras de *Geotrichum candidum*.



Fuente: Durán y col., 1973.

Características fisiológicas.

La temperatura mínima de crecimiento es cercana a 5°C, la temperatura óptima es de 25-27°C. y la máxima es de 33-38°C. La resistencia térmica de *G. candidum* está comprendida entre 55 y 57°C (Eck, 1990). El pH óptimo de crecimiento es de 5.0-5.5°C, pero puede soportar grandes variaciones de pH, con una clara preferencia por los medios ácidos (Carmo-Sousa, 1959). *G. candidum* se caracteriza por ser particularmente sensible a la sal; una ligera disminución en el crecimiento se detecta

en concentraciones del 1%, el umbral de inhibición total se encuentra entre 5-6%. La oscuridad, la aireación y la agitación favorecen su desarrollo, al igual que pequeñas cantidades de gas carbónico (Eck, 1990). Generalmente llega a su fase estacionaria entre las 23 y las 25 horas, esto se debe a su corto tiempo de duplicación (Kier, 1976).

Asimilación de Nutrientes.

Este microorganismo no fermenta ningún tipo de azúcar. los utiliza por la vía de la oxidación. Utiliza el glicerol, la glucosa, la fructosa, la manosa, la sorbosa, la esculina, el manitol, el sorbitol y también la maltosa, la sacarosa, el adonitol y la amigdalina. El ácido láctico, los lactatos y la lactosa pueden constituir una buena fuente de carbono, aunque la lactosa es asimilada muy rara vez (Eck, 1990).

Se ha encontrado que después de las 15 h de incubación la turbiedad no incrementa en cultivos con arabinosa, ribosa, celobiosa, lactosa, maltosa, meliobiosa, sacarosa, treolosa, melezotosa, rafinosa, almidón, glucona-lactona, dulcitol, inositol, manitol, ramnosa, urea, citrato, fumarato, malato o succinato. Mientras que para sorbosa, xilosa, sorbitol, solamente son usadas para crecer después de una fase lag prolongada (Duran, 1973).

Cadwell y col. (1971) estudiaron el efecto que diversas fuentes de carbono tienen en la fase lag, en la velocidad específica de crecimiento y en la producción de biomasa en *Geotrichum*. Encontraron que la fase lag se retarda en medios con galactosa, aunque la velocidad específica de crecimiento sea semejante a la glucosa, mientras que la producción de biomasa es solamente un poco menor que en la glucosa. La producción de biomasa en todas las hexosas excepto galactosa es similar. Las velocidades específicas de crecimiento y la producción biomasa de *G. candidum* son bajas en las fuentes de carbono que son intermediarios en el ciclo de Krebs como: lactato, acetato y piruvato. Los cultivos de *G. candidum* mantienen su morfología filamentosa durante todas las fases del crecimiento en: glucosa, fructosa, manosa y glicerol. Para la sorbosa, sorbitol y xilosa se observa un crecimiento filamentoso, pero las artrosporas son producidas rápidamente en la fase estacionaria. Solamente se observan pequeñas

hifas durante la fase exponencial cuando se crecen en acetato, lactato y piruvato, el medio con estas fuentes de carbono está constituido mayormente por artrosporas.

Utiliza preferentemente fuente de nitrógeno orgánica y sulfatos, desamina el triptófano, la leucina, la metionina, y la fenilalanina. El extracto y el autolizado de levadura estimulan su desarrollo (Eck, 1990).

Actividad enzimática.

G. candidum presenta actividad lipolítica y proteolítica. Las lipasas de *G. candidum* pueden hidrolizar grasas y aceites con ácidos grasos insaturados y saturados (Charton, 1993), produciendo una gran variedad de aldehídos y ésteres responsables de olores y sabores en muchos alimentos. Se sabe que la actividad lipolítica en algunas cepas puede ser inducida; mientras que en otras es constitutiva. Welch Baillargeon y cols. (Baillargeon, 1989), encontraron que la lipasa no se produce cuando al hongo se le hace crecer únicamente con glucosa o sacarosa. En glucosa más aceite de soya o de oliva, la producción de la enzima es menor cuando se usa solo aceite. También mencionaron que la actividad lipolítica disminuye con el tiempo, este fenómeno lo atribuyeron a la presencia de proteasas.

Se ha observado que la actividad proteolítica del género *Geotrichum* aislados de quesos varía de cepa en cepa (Marcellino, 1992). Su sistema enzimático extracelular tiene un pH óptimo de 5.0-5.6, parece formado por dos sistemas capaces de manifestar su acción en los quesos. También se ha encontrado una actividad endopeptídica intracelular inducida por peptonas, cuenta con actividad aminopeptídica exocelular y endocelular (Eck, 1990).

Transporte en Membrana.

Tipos de Transporte

El primer paso para que el metabolismo se lleve a cabo, es el transporte de nutrientes a través de una membrana que separa los componentes intracelulares de su

entorno. Las membranas son altamente selectivas, debido a su naturaleza lipídica, impidiendo el paso de moléculas de carácter polar.

Existen dos tipos de transporte en membrana: transporte no mediado, el cual tiene lugar por difusión simple y el transporte mediado, que requiere la participación de proteínas acarreadoras específicas que son susceptibles de saturarse, de ser inhibidas competitivamente o de inactivarse por químicos. El transporte no mediado no es afectado por la temperatura, ni por inhibidores metabólicos, ni por la concentración de metabolitos internos, ni tampoco por excedentes de algún compuesto externo (Cordova, 1994).

El transporte mediado se clasifica de dos maneras, de acuerdo con la termodinámica del sistema:

a) Transporte pasivo, también llamado difusión facilitada, mediante el cual las moléculas fluyen desde una alta a una baja concentración, hasta equilibrar su gradiente de concentraciones. No requiere de energía, no se afecta por inhibidores metabólicos, esta en función de la temperatura, y se afecta por la saturación del sustrato.

b) Transporte activo, mediante el cual las moléculas son transportadas desde una baja a una alta concentración, es decir, en contra de un gradiente de concentraciones. Se requiere de la participación de proteínas específicas acarreadoras, por lo que hay un gasto de energía. Depende de la temperatura y de la saturación del sustrato. La proteína acarreadora puede ser inhibida por sustratos análogos por lo que es sensible a inhibidores metabólicos (Gadd, 1989).

Metabolismo de Carbohidratos.

Las fuentes de carbono proveen de energía y sirven como precursores para la síntesis de estructuras celulares. Los carbohidratos son usados preferentemente como fuente de carbono por los hongos, aunque también los ácidos grasos orgánicos son metabolizables. Muchos hongos pueden utilizar una gran cantidad de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, aunque el transporte hacia dentro de las células está

restringido a los monosacáridos (Smith, 1975). Se ha encontrado que la maltosa puede ser acarreada intacta por algunos hongos, mientras que los di y polisacáridos tienen que ser cortados por las enzimas, que son secretadas en el medio o se encuentran adheridas a la membrana celular, v.g: amilasas, celulasas, invertasas; estas enzimas son frecuentemente inducibles (Smith, 1975).

Generalmente la asimilación de carbohidratos es un proceso activo, que muchas veces involucra una reacción de fosforilación. Los monosacáridos libres no pueden ser acumulados en la célula durante su transporte, pero muchas hexosas son convertidas a glucosa-6-fosfato ó fructosa-6-fosfato, para después ser metabolizadas por la vía de la glicólisis, por lo que la velocidad de asimilación de los carbohidratos frecuentemente limita la velocidad de crecimiento de los hongos. Asimismo, afectan la velocidad de asimilación de los carbohidratos otros componentes del medio como la relación C/N, así como la presencia de iones divalentes, el pH, la temperatura, la concentración de carbohidrato, etc (Smith, 1975).

En *Saccharomyces* la glucosa se transporta al interior de la célula por difusión facilitada (Griffin, 1981), y se ha encontrado también que cuenta con un sistema de transporte constitutivo para D-glucosa, D-fructosa y D-manosa y un sistema inducible para galactosa. Cuando la glucosa o carbohidratos de estructura similar están presentes en una mezcla con otros azúcares, los primeros son usados preferentemente por acción del sistema de transporte acarreador y cuando se agotan, empiezan a funcionar los sistemas inducibles. *Neurospora* cuenta con un sistema de difusión facilitada cuando crece en altas concentraciones de glucosa (Griffin, 1981).

El transporte de maltosa ocurre junto con el acarreo de H⁺ y para mantener la electroneutralidad ocurre un flujo de K⁺ o depende de la permeabilidad del anion.

En cuanto a los disacáridos, como la trealosa y la sacarosa primero se hidrolizan en sus monosacáridos. Sin embargo, existen evidencias de que la sacarosa atraviesa la

membrana intacta en *S. cerevisiae*, mediante transporte activo, que involucra la entrada de H⁺ y manteniendo la electroneutralidad con la salida K⁺.

Existe otro mecanismo para el transporte de carbohidratos en levaduras. Este es un mecanismo de traslocación de grupo, donde se involucra la fosforilación del azúcar que entra en contacto con la membrana plasmática, para que se lleve a cabo el transporte del azúcar fosforilado dentro de la célula. Los polifosfatos, como donadores de fosfatos, son esenciales para este mecanismo de transporte activo, (Gadd, 1989).

Tabla 8. Características de algunos sistemas de transporte de azúcares en hongos y levaduras.

Mecanismo de Transporte	Constitutivo /Inducibles	Organismo	Sustancias Transportadas
Difusión Simple	—	<i>S. cerevisiae</i>	D-Ribosa.
	—	<i>Rhodotorula glutinis</i>	D-Ribosa
Difusión Facilitada	Constitutiva	<i>S. cerevisiae</i>	D-Glucosa D-Fructosa D-Manosa
	Inducible	<i>Neurospora crassa</i>	D-Glucosa
Transporte Activo	Inducible	<i>S. cerevisiae</i>	D.Galactosa
		<i>Rhodotorula glutinis</i>	D-Glucosa D-Mannosa D-Fructosa D-Xilosa D-Galactosa L-Ramnosa Sorbitol
	<i>Aspergillus nidulans</i>	D-Glucosa D-Galactosa D-Fructosa	
	<i>S. cerevisiae</i>	Maltosa	
	<i>Neurospora crassa</i>	D-Glucosa.	

Fuente: Adaptada de Gadd, 1989.

En algunos hongos se ha encontrado que el transporte de ácidos monocarboxílicos se lleva a cabo por un sistema de transporte saturable (Castro, 1994).

Por otro lado, Kennes y col (1991), reportan un sistema para acarrear moléculas de citrato al interior de la célula en *L. plantarum*, en el que se requiere de una proteína específica como la citrato permeasa.

OBJETIVOS

Determinar el consumo de los carbohidratos presentes en la masa (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y almidón) por *Geotrichum* sp. aislado de pozol, así como el efecto del aceite de maíz y del ácido láctico en el crecimiento del hongo.

Determinar la velocidad de crecimiento de *Geotrichum* en un medio complejo (masa de maíz).

Diseñar un medio de cultivo químicamente definido para evaluar el crecimiento y consumo de los carbohidratos, cuya formulación se aproximará a la composición salina de la masa.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo.

Se utilizaron cuatro cepas:

-*Geotrichum candidum* (GC) del cepario de la Facultad de Química, UNAM.

-*Geotrichum* sp. (GB) aislado de leche búlgara por el grupo de la Dra. Carmen Wacher, Depto de Alimentos y Biotecnología, Facul de Química, UNAM.

-*Geotrichum* (GPI) aislado de pozol indígena (Canas, 1993).

-*Geotrichum* (GPC) aislado de pozol mestizo (Canas, 1993).

Se mantuvieron en tubos inclinados de Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura de 4°C.

Medios de Cultivo sólidos para la selección de la cepa.

Se elaboraron medios sólidos con harina de masa de maíz "Maseca", en concentraciones de: 2, 3, 4, 5, y 6%, usando agar bacteriológico al 1% como soporte.

Medio PDA: Agar Papa Dextrosa (Difco) al 3.9% y Agar Bacteriológico al 0.5% (Oxoid).

Medio GELP (Glucosa, Extracto de Levadura Peptona): 2% de glucosa, 0.5% de extracto de levadura y 1% de peptona (Carmona-Sousa, 1959).

Medio MAA: Medio basal S (Tabla 9) con 1% de almidón de maíz y 1.5% de agar bacteriológico.

Medio MTB: Medio basal S (Tabla 9) con 1% de Tributirina (Kouser, 1987) y el 1.5% de agar bacteriológico.

Tabla 9. Medio Basal S.

Compuesto	g/100 ml
KH_2PO_4	0.623
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.372
MgSO_4	0.025
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1

Fuente: Durán, 1973

Medios de cultivo líquidos empleados en las fermentaciones.

Para evaluar el crecimiento de *G. candidum* se probaron dos medios basales, el primero identificado como S (Trinci, 1971) y el medio SM (semejante a la masa) se elaboró basándose en el medio de Allen (1981), pero modificándolo según la composición de los principales minerales de la masa nixtamalizada.

El medio basal identificado como SM (semejante a la masa) se diseñó de acuerdo a la proporción de algunos minerales que se encuentra en la masa de maíz. Principalmente las sales de fosfatos, magnesio, calcio, potasio y nitrógeno.

Tabla 10. Medio SM.

Compuesto	g/100 ml
KH_2PO_4	0.8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.058
MgSO_4	0.49
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.058
CaCl_2	0.038

Fuente: Allen, 1981.

Fuentes de carbono.

Como fuentes de carbono se utilizaron los carbohidratos solubles que se encuentran en la masa como: D-glucosa, D-fructosa, D-maltosa y sacarosa; además de almidón y ácido láctico, todas al 1% (a menos de que se especifique lo contrario).

Se utilizó aceite de maíz en una proporción del 4.5% que corresponde a la cantidad en que se encuentra en los granos de maíz (Fennema, 1985).

Medio complejo.

Elaborado a partir de harina de masa nixtamalizada marca "Maseca", a una concentración del 4%.

Los medios se esterilizaron a 121°C y 15 psi de presión, durante 20 min. El medio S se esterilizó en dos partes, una parte la constituía la fuente de carbono y la otra parte la

mezcla de sales. Mientras que el medio SM se esterilizó en cuatro partes: la fuente de carbono, la sal de calcio, la sal de magnesio y las sales restantes.

Cosecha de esporas (artrosporas).

Para obtener las esporas e inocular los medios en las fermentaciones, las cepas se propagaron en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio PDA, incubando a 30°C durante 48 h. Después de este tiempo las esporas se obtuvieron raspando la superficie del medio y extrayendo con agua destilada estéril. El inóculo se preparó a una concentración final de 1×10^6 esp/ml de medio. La concentración de esporas se determinó usando una cámara de Newbauer.

El pH inicial (pHi) en los medios fue de 6.0, salvo que se especifique lo contrario.

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio, incubándose a 30°C, durante 48 h a 100 rpm en una agitadora elipsoidal New Brunswick Scientific (Controlled environment incubator shaker).

Crecimiento celular.

El crecimiento del microorganismo fue evaluado por peso seco, por densidad óptica y por proteína celular. El peso seco se determinó filtrando un volumen conocido de la muestra, utilizando membranas millipore de 0.5 μm de diámetro de poro, estas se pusieron a peso constante y pesadas previamente, la biomasa retenida en la membrana se secó y se puso a peso constante en una estufa a 60°C por 24 h. Pasado este tiempo se pesaron y por diferencia se calculó el peso seco, reportado en unidades de mg de biomasa seca por ml de medio (mg/ml). La densidad óptica se expresó como la absorbancia de las células lavadas, por centrifugación y enjuagadas con agua destilada para eliminar remanentes del medio, las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 450 nm (Trinci, 1971), usando como blanco agua destilada.

El crecimiento celular por proteína celular, se le determinó al paquete de células lavadas, mediante el método de Lowry (Lowry, 1951), usando albúmina de huevo como estandar.

Para los medios de almidón y masa las muestras se centrifugaron y al botón se le determinó la concentración de proteína.

Para poder comparar los resultados que se obtuvieron de los diferentes métodos para evaluar crecimiento celular, se crearon gráficas de correlación. En la Figura 5 se observa la correlación de peso seco vs. densidad óptica, en donde el máximo valor de peso seco que sería de 1.2 mg/ml, se obtiene un valor de densidad óptica de 1.01 unidades de densidad óptica (UDO).

Mientras en la Figura 6, donde se gráfica el peso seco vs. proteína celular, para el máximo valor de peso seco que es 1.2 mg/ml se obtuvo un valor de proteína celular de 175 µg/ml.

Estas correlaciones ayudaron a comparar los valores entre una forma y otra de determinar crecimiento, ejemplo fue necesario hacer una curva que correlacionara los parámetros. La primera gráfica fue de peso seco vs. densidad óptica, donde se observa que si hay correlación lineal entre ambos parámetros, lo que permitió extrapolar los datos y comparar el crecimiento cuando se hacía por una forma u otra.

Cuantificación de Azúcares Residuales.

La determinación se realizó por el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico (Miller, 1959), las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic 20, Bausch and Lomb. Se construyeron curvas patrón para los azúcares: D-glucosa, D-fructosa, maltosa y sacarosa. Para la sacarosa, la solución estandar se hidrolizó con HCl conc. se dejó reposar durante 24 h y se neutralizó con NaOH 2N, se aforó a un volumen conocido y de esta solución se hicieron diluciones para la obtener la curva patrón.

Determinación de pH.

La medición de pH se realizó en un potenciómetro Corner pHmeter 320.

Determinación de actividad en geles de agar por Difusión.

Actividad amilolítica.

La actividad amilolítica se determinó por difusión en geles de agar, utilizando los filtrados libres de células, se preparó agar a una concentración de 1.0% más 0.15% de almidón soluble, se disolvieron en 16 ml de buffer de acetatos 0.17N a pH 6.0, calentándose hasta su completa disolución, esta mezcla se vació de manera uniforme en vidrios de 16 x 13 cm previamente puestos en una estufa a 50°C, la mezcla se dejó solidificar, una vez solidificada se hicieron perforaciones con un diámetro de 0.7 cm. A cada pozo se le añadió 10 ml de muestra (filtrado) y se incubaron a 30°C durante 24 h. Para observar la actividad amilolítica los geles fueron revelados con solución de lugol, determinando el diámetro del halo.

Actividad lipolítica.

Para evaluar la actividad lipolítica a los filtrados (ver párrafo anterior) así como a las muestras liofilizadas, se preparó agar purificado en una concentración de 1.0%, se disolvió en 13 ml de buffer de acetatos 0.17N pH 6.0, y se mantuvo en baño María. por otro lado se preparó una mezcla con 4 ml de rodamina 6G al 1% (Kouser, 1987), 0.8 ml de tritón 100X como emulsificante y 2 ml de sustrato (aceite de oliva ó tributirina), esta mezcla fue calentada en baño maría durante 5 min y después se mezcló con el agar disuelto en la solución buffer, se homogeneizó en un Ultra-Turrax, Yankee & Kufel KG. Staufen, Federal Republic of Germany. La mezcla se vació al vidrio (ver párrafo anterior), dejando gelificar, una vez solidificado el agar, se hicieron los pozos, se colocó la muestra, se incubó 12 h y se observó el gel a través de un Transiluminador de luz UV.

Figura 5. Gráfica de Correlación. Peso Seco vs. Densidad Óptica.

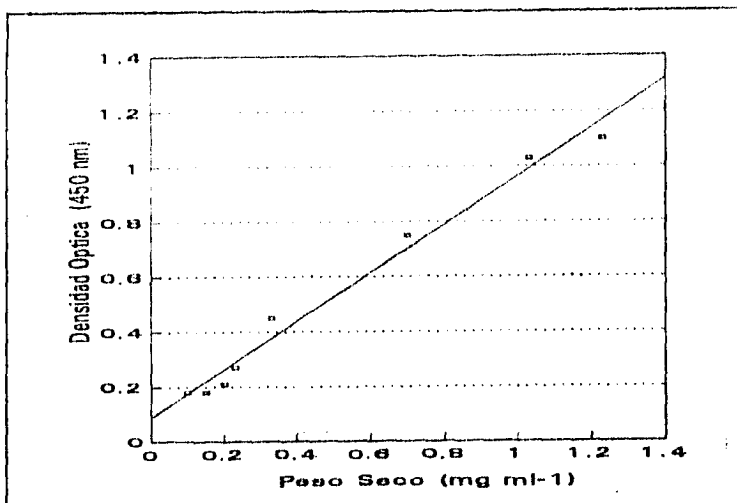
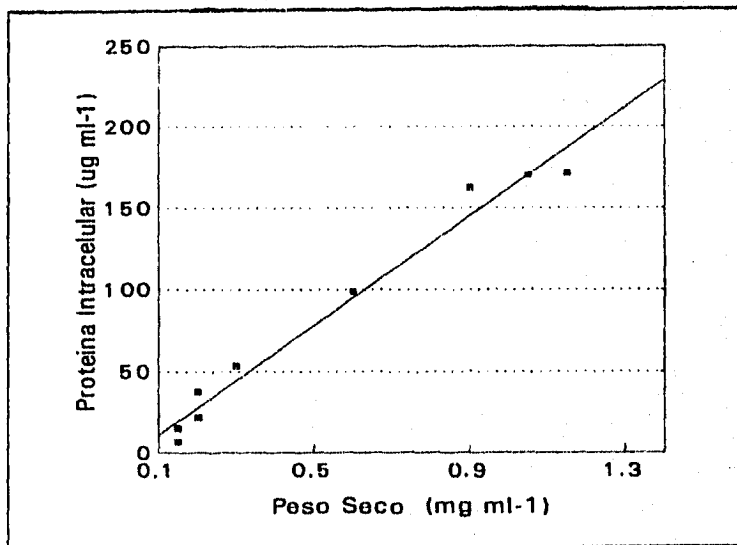


Figura 6. Gráfica de Correlación. Peso Seco vs. Proteína Intracelular.



RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de la cepa

La selección de la cepa se realizó para obtener un microorganismo típico de pozol que proporcionara las características más comunes de este producto fermentado que sería: crecimiento sobre la superficie de la masa, crecimiento abundante, producción de aromas característicos del pozol, etc. Por lo que para seleccionar una de las cuatro GB, GPI, GP y GC (ver materiales y métodos): se procedió a realizar lo siguiente:

Crecimiento de las cepas en caja Petri en medios de: Masa, PDA y GELP,
Crecimiento en medio con almidón y tributirina,
Aroma producido en los medios de masa.

Crecimiento en Masa de maíz a diferentes concentraciones.

Se inocularon por punto central las cuatro cepas, en placas con harina de maíz a diferentes concentraciones: 2, 3, 4, 5 y 6%. Se incubaron a 30°C durante seis días, evaluándose a este tiempo el diámetro de la colonia (Figura 7).

Se observó que para las placas con masa al 2 y 3% de concentración, el valor del diámetro de la colonia para la cepa de GPC fue de 7.3 cm, siendo el mayor con respecto a las tres cepas restantes, mientras que en las concentraciones 5 y 6%, el diámetro resultó ligeramente mayor para GPI. Las cepas GB y GC, se desarrollan de igual manera en todas las concentraciones probadas, su diámetro de crecimiento osciló entre 5.0 y 5.3 cm. Lo anterior nos indica que los microorganismos aislados de pozol, crecen más en masa, sustrato del que se elabora el pozol que cepas GB y GC. Es importante hacer notar que la colonia formada no era densa en todas las concentraciones de masa probadas.

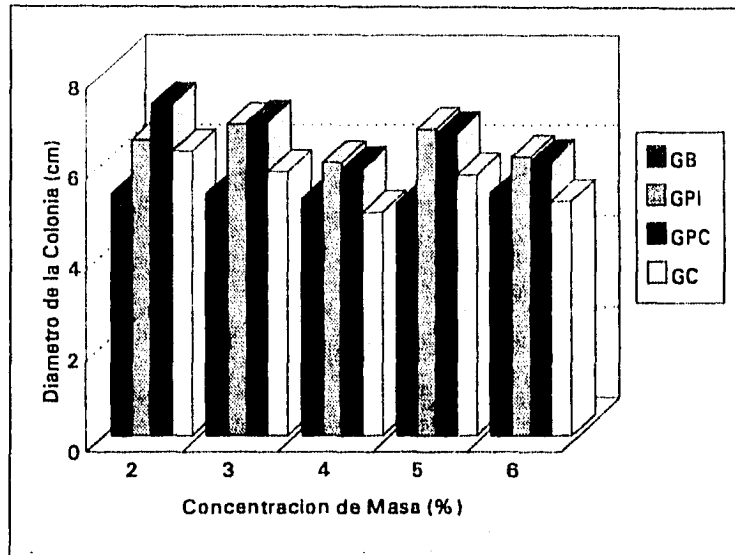


Figura 7. Diámetro de la colonia al séptimo día de incubación de las cuatro cepas de *Geotrichum* en diferentes concentraciones de masa, sembradas por punto central en cajas Petri e incubadas a 30°C.

Crecimiento en medios de PDA y GELP.

Una vez evaluado el crecimiento de las cepas en varias concentraciones de masa, y encontrando que el comportamiento es similar para las cepas provenientes de pozol, se realizó la siguiente prueba: se sembraron las cuatro cepas en los medios de PDA y GELP. Al evaluar los diámetros de crecimiento en PDA (Figura 8), se observó que las cepas GB y GC crecen de manera semejante, alrededor de 3.7 cm, mientras que las cepas GPI y GPC alcanzan una longitud de diámetro de halo de 5.7 cm aprox. Por otro lado en el medio GELP el valor del diámetro es mayor para las cuatro cepas comparado con el obtenido en PDA, en este medio GB alcanza un valor de 5.9, seguido de la cepa GPC de 6.2 cm.

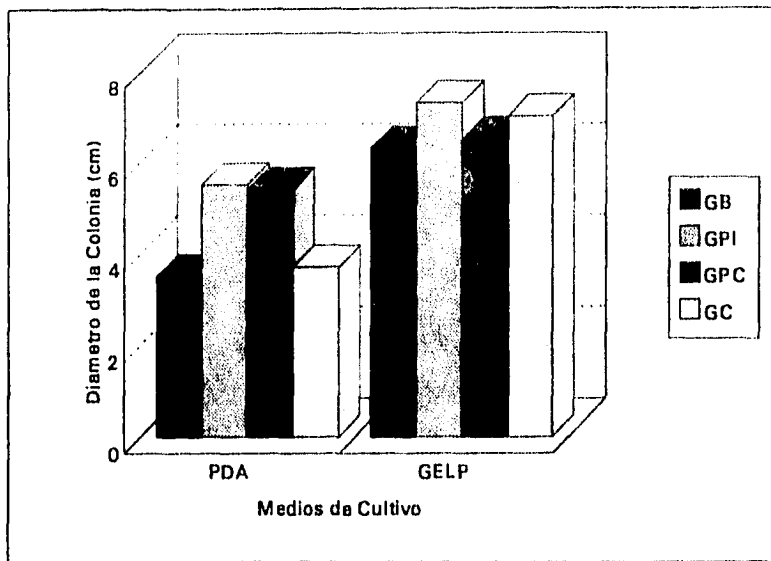


Figura 8. Crecimiento de las cuatro cepas de *Geotrichum* al séptimo día de incubación en diferentes medios, en cajas Petri sembradas por punto central, incubadas a 30°C.

En este medio GC crece hasta 7.3 cm, siendo la cepa GPI la que resultó tener un diámetro de crecimiento ligeramente mayor que la anterior. Las colonias en estos medios era muy densas, de hecho las colonias formas en el medio GELP tenían aspecto de fieltro. Por lo que es este ensayo resulto que las cepas que tienen un mayor crecimiento son GPI y GC.

Crecimiento en medios con almidón y tributirina

Crecimiento en almidón

La masanixtamalizada como ya se mencionó, esta constituida principalmente por almidón, por lo que era importante observar como crecían estas cepas en este sustrato. Las cuatro cepas se sembraron por punto central, en cajas Petri con almidón como única fuente de carbono y medio salino S (medio MAA), se incubaron a 30°C,

mediéndose el diámetro de la colonia durante seis los seis días de incubación (Figura 9).

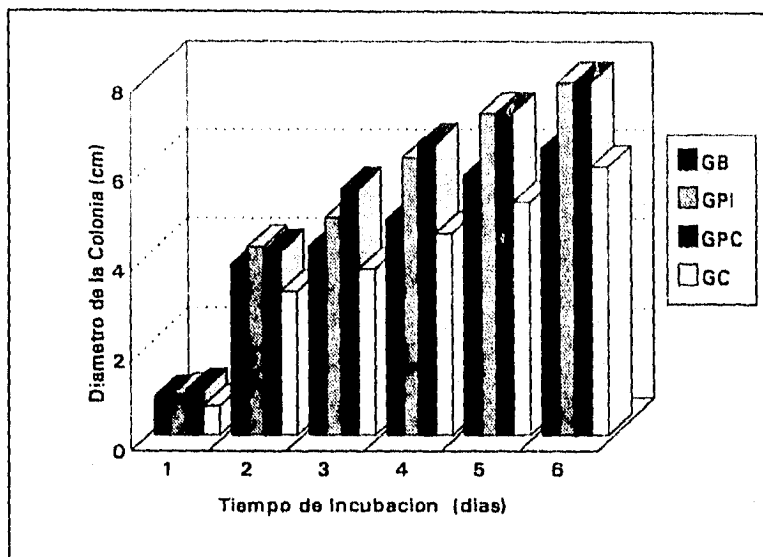


Figura 9. Crecimiento de las cuatro cepas de *Geotrichum* en almidón de maíz como única fuente de carbono al séptimo día de incubación en cajas Petri sembradas por punto central, incubadas a 30°C.

Al comparar las longitudes de las diferentes cepas, se observa que las cepas GPI y GPC empiezan a tener mayor longitud de diámetro de colonia a partir del tercer día, llegando a 8 cm al sexto día, la cepa que continua en crecimiento es GB, llegando a 6.3 cm, mientras que la cepa GC apenas si llega a 6.0 cm. Sin embargo se debe mencionar que la densidad de las colonias en los cuatros casos es muy tenue, por lo que no se puede comparar con los crecimiento obtenidos en masa a diferentes concentraciones ni aun en los obtenidos en PDA y GELP.

Se reveló con lugol al sexto día de incubación y únicamente se observó un pequeño halo de color café para las cuatro cepas, lo que indica una hidrólisis parcial del almidón por los microorganismos. Por obtener los mayores valores, las cepas aisladas de pozol tienen mayor capacidad de aprovechar este polisacárido que las otras cepas del mismo género pero aisladas de diferentes fuentes. Sin embargo Avena y cols en 1975 (Avena, 1975) reportaron que este género no consume almidón por lo tanto no producen amilasa. También Nuraida y cols (Nuraida, 1995) reportaron que cepas de *Geotrichum* aisladas de pozol no hidrolizan el almidón ni lo utilizan para su crecimiento.

Crecimiento en Tributirina.

La tributirina es un triglicérido que se utiliza frecuentemente para determinar actividad lipolítica o para determinar si un microorganismo es capaz de degradar los lípidos. Sus propiedades se prestan para determinar fácilmente si utiliza el compuesto ya que los medios con tributirina son opalescentes y un halo transparente se expresa como la utilización de lípido, por lo cual se utilizó para determinar la capacidad de degradación de las grasas por las cuatro cepas con las que se trabajaron.

Se procedió a inocularlas de la misma manera que en el almidón, utilizando el medio MTB. Al medir los diámetros de las colonias se observó que es la cepa GPC la que obtiene un mayor crecimiento, rebasando los 6.2 cm, seguida de GB y GPI que obtienen valores muy semejantes, alrededor de 5.8 y 5.7 cm respectivamente (Figura 10). La cepa GC llega a medir 4.7 cm. Las cuatro cepas produjeron un halo de hidrólisis que se observaba alrededor de la colonia, este halo era mayor que el obtenido en almidón.

En este caso como en almidón la densidad de las colonias era muy tenue por lo que tampoco se puede relacionar o comparar con los medios de masa y PDA y GELP. Sin embargo las cuatro cepas pueden utilizar la rodamina para crecer (degradar lípidos).

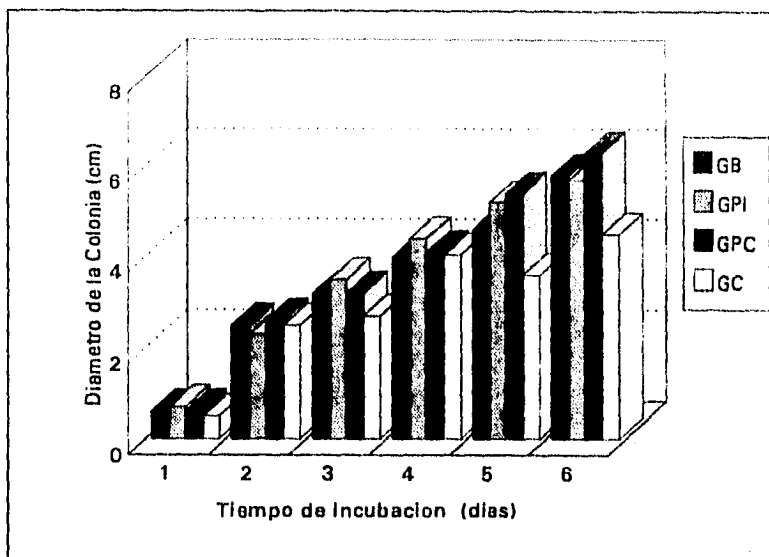


Figura 10. Crecimiento de las cuatro cepas de *Geotrichum* en Tributirina como única fuente de carbono, en cajas Petri sembradas por punto central e incubadas a 30°C.

Resumiendo, las cepas aisladas de pozol hasta el momento presentaban características muy similares: mayor crecimiento en medios con masa, mayor crecimiento en el medio GELP de la cepa GPI, aunque aquí la cepa GC creció a valores muy similares. Sin embargo GPC, creció ligeramente más en medios con almidón y en tributirina. Por lo que se procedió a evaluar la producción de aromas para definir que microorganismo utilizar entre GPI y GPC.

Aroma producido en los medios de masa.

Simultáneamente a la medición del diámetro de crecimiento en los medios con masa, se evaluaron los aromas y olores producidos por las cuatro cepas, y se clasificaron de la siguiente manera:

a) aromas semejante al pozol (este se percibe cuando aparece el crecimiento blanquecino en las bolas de pozol).

b) aroma afrutado (manzana, pera, plátano).

c) masa agria.

Haciendo un análisis de estos aromas producidos para las cepas se elaboró la siguiente tabla:

Tabla 9. Aromas producidos por las cepas del género *Geotrichum*, sembradas en cajas Petri en medios de masa.

Cepa	Aroma a pozol	Aroma afrutado (manzana, pera, plátano)	Masa agria
GB (<i>Geotrichum</i> aislado de leche búlgara).	--	+	++
GPC (<i>Geotrichum</i> aislado de pozol mestizo).	++	+++	++
GPI (<i>Geotrichum</i> aislado de pozol indígena).	+++	+++	--
GC (<i>Geotrichum</i> cepario Fac. Química).	--	--	+++

(-) no se percibe, (+) se percibe poco, (++) se percibe, (+++) el olor es el característico.

La tabla nos muestra que las cepas GPC y GPI produjeron los aromas característicos del pozol y los olores afrutados que en la fermentación espontánea se da, producto de la acción de los microorganismos que se desarrollan de forma natural. Por otro lado la cepas GB y GC, produjeron olores a masa agria al igual que GPC. Mientras que la

cepa GPI no produjo el aroma a masa agria por lo tanto la cepa GPI resultó por esta prueba ser la más adecuada para ser seleccionada y continuar con el trabajo, ya que reunió las características típicas que se dan en el pozol: crecimiento en masa, crecimiento abundante en la superficie, utilización parcial del almidón, utilización de lípidos y aromas característicos. Por otro lado la cepa GB permitió observar las diferentes características que los microorganismos tienen al ser aislados de diferentes substratos y GC, nos permitió comparar las diferencia que existen entre microorganismos ya identificados en género.

Comparación de los medios de cultivo SM y S.

Una vez seleccionada la cepa GPI, que en lo sucesivo se llamará *Geotrichum* sp., se procedió a realizar fermentaciones sumergidas, para lo cual se requirió trabajar con un medio químicamente definido y a la vez semejante a las proporciones de sales minerales de la masa (Allen, 1981). Este medio se designó como SM (semejante a la masa) y fue comparado con un medio reportado para el crecimiento de *Geotrichum candidum* (medio S).

Las fermentaciones se realizaron utilizando glucosa como fuente de carbono al 0.5%, a pH de 6.5, temperatura de 30°C y una agitación de 100 rpm.

El crecimiento se evaluó como peso seco (Figura 11A) y también como densidad óptica a 450 nm (Figura 11B), para comparar el comportamiento del crecimiento por los dos métodos y saber si era posible medir el crecimiento celular como densidad óptica para esta cepa de *Geotrichum* sp.

Al comparar el crecimiento en ambos medios evaluado como densidad óptica, se observó (Figura 11A) que es prácticamente igual. El microorganismo alcanza los mismos niveles de biomasa llegando a un máximo aproximadamente a las 18 h; entrando en fase estacionaria después de este tiempo. El peso seco para la cepa en medio SM es ligeramente mayor que el obtenido en el medio S. El comportamiento

tanto por peso seco como por D.O. es prácticamente igual de manera que el crecimiento puede evaluarse por cualquiera de estos dos métodos.

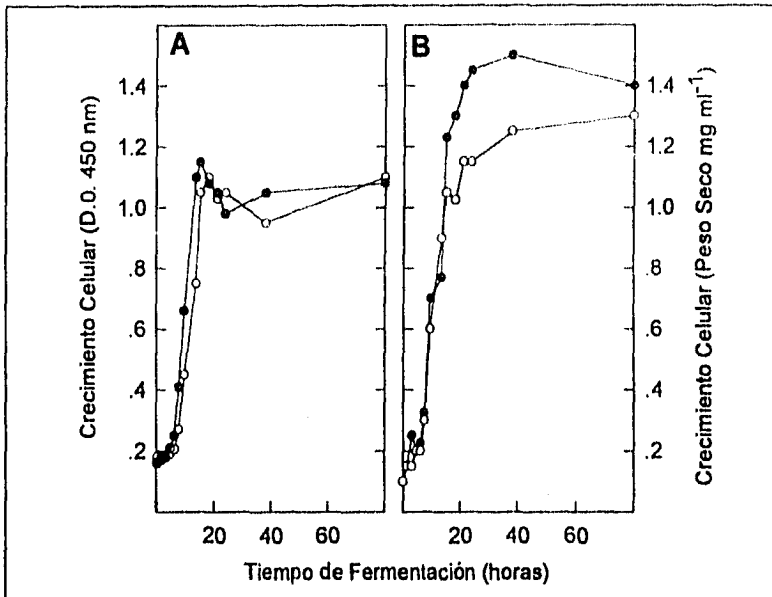


Figura 11. Comparación de las curvas de Crecimiento Celular de *Geotrichum* sp. en los medios SM (●) y S (○) evaluado como Densidad Óptica y Peso Seco.

El crecimiento de *Geotrichum* sp. es similar en ambos medios a pesar de que su composición es diferente. El medio SM que se formuló basado en la composición mineral de la masa es capaz de soportar un crecimiento de *Geotrichum* aparentemente sin problema, por lo que parece ser un buen medio para el estudio del crecimiento de este microorganismo.

Efecto del pH en la asimilación de glucosa y crecimiento de *Geotrichum* sp.

Durante la fermentación espontánea del pozol el pH se ve modificado por la acción de la flora microbiana, entre las que destacan las bacterias lácticas. Por lo cual

se evaluó el crecimiento de *Geotrichum* sp. en el medio SM y el consumo de glucosa al 1% a diferentes valores de pHi (pH inicial) los cuales fueron: 6.0, 4.7 y 3.8. El pH se ajusto con ácido sulfúrico 0.1 M.

La Figura 12 muestra un mayor crecimiento a pHi de 3.8 seguido de 4.8, mientras que para un pHi de 6.0 se obtuvo un menor crecimiento, alrededor de una unidad de absorbancia, que representa el 60% del obtenido en los otros valores de pH. El crecimiento mayor se alcanza a las 24 h de fermentación.

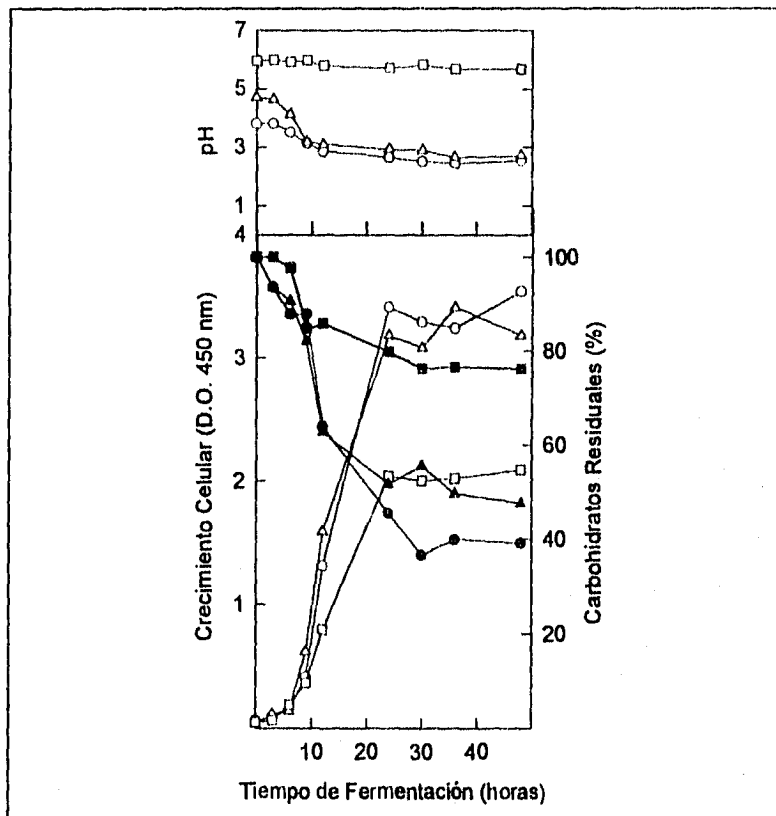


Figura 12. Crecimiento celular (símbolos abiertos) y consumo de glucosa (símbolos cerrados) de *Geotrichum* sp. a diferentes valores de pH: pH 3.8 (○); pH 4.8 (△); pH 6.0 (□).

Al evaluar el consumo de la glucosa, se observó que el patrón de consumo es diferente en los tres valores de pH_i, a pH_i de 3.8 y 4.8 el consumo fue del 65 y 50% respectivamente. Por otro lado a pH_i de 6.0 el consumo no es mayor del 25%, siendo mucho menor que en los dos casos anteriores. El pH en el transcurso de la fermentación en los tres casos disminuyó, para pH_i de 3.8, se llegó a valores de 2.4 a las 24 h, manteniéndose en niveles similares el resto de la fermentación, para pH_i de 4.8 se llega a valores de 2.8 a las 30 h de la fermentación. Para pH_i de 6.0 el valor al final de la fermentación es de 5.7.

En los tres casos se observó, sin embargo, que el consumo no rebasó valores del 60%, por lo que se pensó que esto se debía a la relación C/N, de la fuente de nitrógeno en el medio SM, que comparada con la relación C/N del medio S es baja. Para probarlo se adicionó un pulso de nitrógeno, (NH₄)₂SO₄, al medio SM, a una concentración igual a la inicial (Figura 13), a las 12 h de fermentación (fase media exponencial), observándose que el consumo de glucosa no se aumenta a pesar de que se agregó el doble de nitrógeno. Con esto se demostró que el consumo de glucosa no está limitado por la cantidad de nitrógeno en el medio.

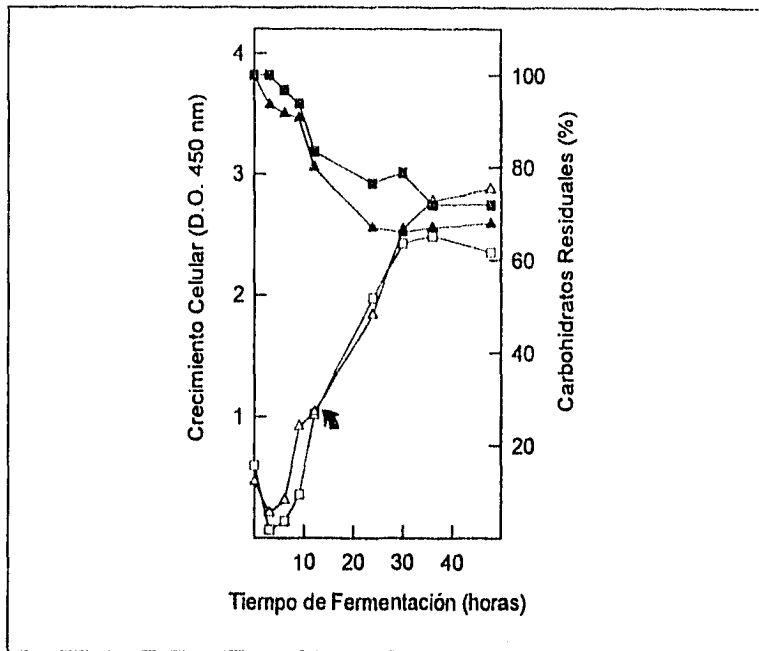


Figura 13. Efecto de la concentración de Nitrógeno en el crecimiento (símbolos abiertos) y consumo de glucosa (símbolos cerrados) de *Geotrichum* sp. sin pulso de Nitrógeno (□) con pulso de Nitrógeno, la en donde indica la flecha (△).

Crecimiento de *Geotrichum* sp. en Monosacáridos.

En la masa nixtamalizada se encuentra la fructosa además de la glucosa. En la Figura 14 se observan las gráficas del comportamiento de *Geotrichum* sp. creciendo en ambos monosacáridos.

La glucosa como se ha observado en figuras anteriores se consume alrededor del 25% (Figura 14A), mientras que la fructosa es consumida hasta en un 40% (Figura 14B). El máximo consumo ocurre entre las 24 h de fermentación entrando en la fase estacionaria después de este tiempo en ambos casos (Figura 14).

El crecimiento en glucosa es menor al obtenido en fructosa, lo que hace sentido de acuerdo al consumo de cada uno de estos carbohidratos. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado para *Geotrichum candidum* por Cadwell y Trinci (1973). Estos autores reportaron que la producción de biomasa en relación al sustrato consumido, es mayor para fructosa que para la glucosa, lo cual correlaciona con lo que encontramos en este trabajo con la cepa silvestre de *Geotrichum*.

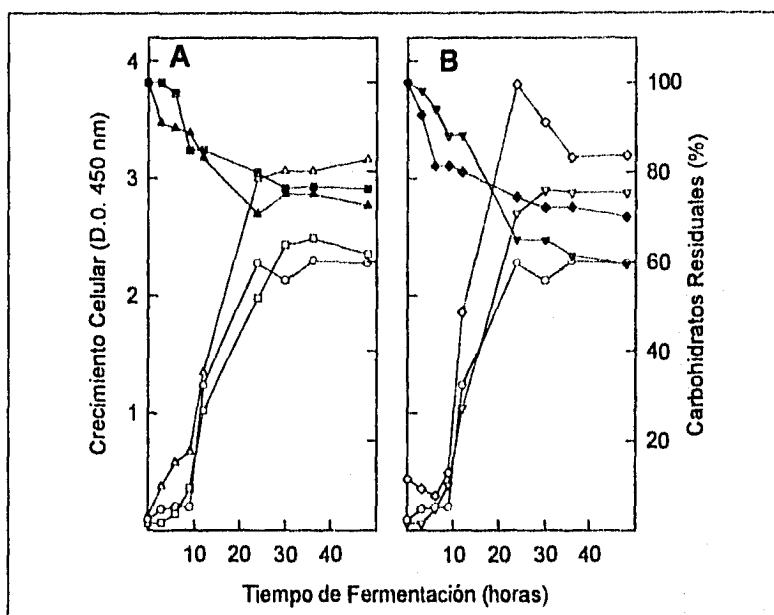


Figura 14. Crecimiento (símbolos abiertos) y consumo de monosacáridos (símbolos cerrados) de *Geotrichum* sp. Fig. 14A glucosa (□); glucosa+aceite de maíz (△); aceite de maíz (○). Fig. 14B fructosa (▽); fructosa+aceite de maíz (◇); aceite de maíz (○).

En la masa además de los carbohidratos se encuentran otros nutrientes como lípidos y proteínas, los cuales pueden ser utilizados como fuente de energía por la flora microbiana durante la fermentación del pozol. *Geotrichum* sp. es un microorganismo

que se caracteriza por la producción de enzimas hidrolíticas como lipasas y proteasas (Eck, 1990). Por lo anterior se evaluó el efecto de la adición de aceite de maíz en los medios con glucosa y fructosa.

En el medio de glucosa+aceite de maíz se obtuvo un mayor crecimiento que en el control con glucosa sola, pero no se modificó el nivel de consumo de este monosacárido (Figura 14A).

En el caso de fructosa, la adición de aceite favoreció el crecimiento ya que se obtienen 11 unidades porcentuales más que en el medio de fructosa sola (Figura 14B). Mientras el consumo de fructosa se ve afectado y de hecho se redujo en un 10% respecto al medio de fructosa únicamente.

Por otro lado el crecimiento en aceite de maíz como única fuente de carbono es muy cercano al obtenido con glucosa y menor al obtenido con fructosa y se estimula en presencia de las dos fuentes de carbono en forma simultánea. Se ha reportado que las lipasas de *Geotrichum candidum* se ven afectadas por la presencia de glucosa (Baillargeon, 1989). Esto puede explicar por que en los medios con glucosa y fructosa el crecimiento de *Geotrichum* sp. es mayor y el consumo de los monosacáridos se mantiene igual o incluso disminuye ligeramente.

Esto sugiere que *Geotrichum* sp. es capaz de utilizar el aceite de maíz como fuente de carbono alterna a los monosacáridos.

Crecimiento de *Geotrichum* sp. en Disacáridos.

Los disacáridos más abundantes en la masa son la sacarosa y la maltosa por lo cual se hizo crecer a *Geotrichum* sp. en maltosa por un lado y en sacarosa por el otro. En la Figura 15, se observa que el crecimiento en ambos disacáridos es muy pobre en relación a lo obtenido en los monosacáridos, alcanzando valores del orden del 15-20%.

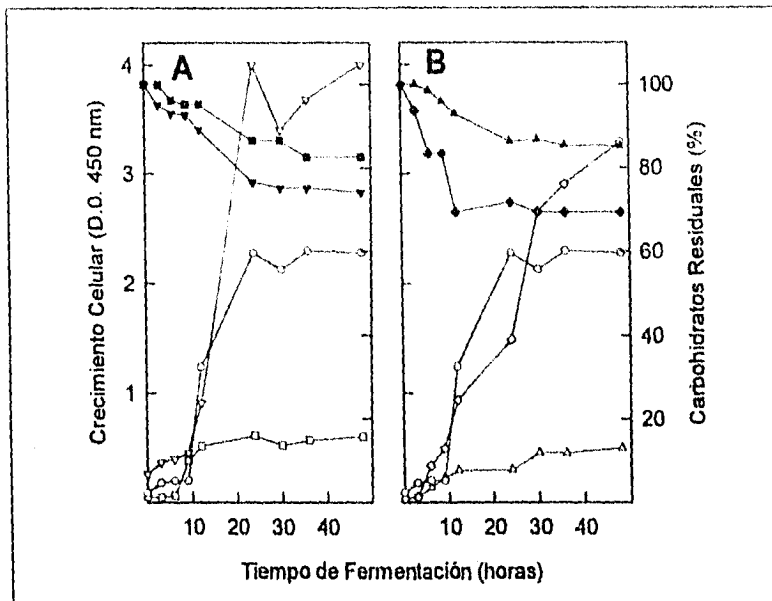


Figura 15. Crecimiento (símbolos abiertos) y consumo de disacáridos (símbolos cerrados) *Geotrichum* sp. Fig. 15A maltosa (□); maltosa+aceite de maíz (▽); aceite de maíz (○). Fig. 15B sacarosa (△); sacarosa+aceite de maíz (◇); aceite de maíz (○).

El consumo máximo de maltosa es del 19% mientras que el de sacarosa es del 16%. Cuando se adicionó aceite de maíz en presencia de maltosa (Figura 15A), el crecimiento aumento ocho veces en relación al medio con maltosa sola y el consumo de está fué del 27%. Este fenómeno se presenta de manera semejante en los medios de sacarosa y sacarosa+aceite de maíz (Figura 15B), en donde también se obtuvo un crecimiento de ocho veces más en la mezcla del disacárido+aceite de maíz que con sacarosa sola, lo que consecuentemente también aumentó el consumo de la sacarosa.

En ambos casos la adición de aceite estimuló el crecimiento y el consumo de estos disacáridos, obteniéndose crecimientos mayores que en aceite solo.

Efecto del ácido láctico en el consumo de los Carbohidratos y crecimiento de *Geotrichum sp.*

El ácido láctico se encuentra en la masa de pozol, producto del metabolismo de las bacterias lácticas. Se evaluó el crecimiento de *Geotrichum sp.* en el medio en la mezcla de los carbohidratos solubles de la masa de maíz: glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa cada uno al 0.25% con y sin ácido láctico. En la Figura 16 se observa como el consumo de los carbohidratos solubles aumentó alrededor de 20 unidades porcentuales al adicionarle ácido láctico, con respecto al medio con la mezcla de los carbohidratos solubles solos, siendo de 57% y 39% respectivamente.

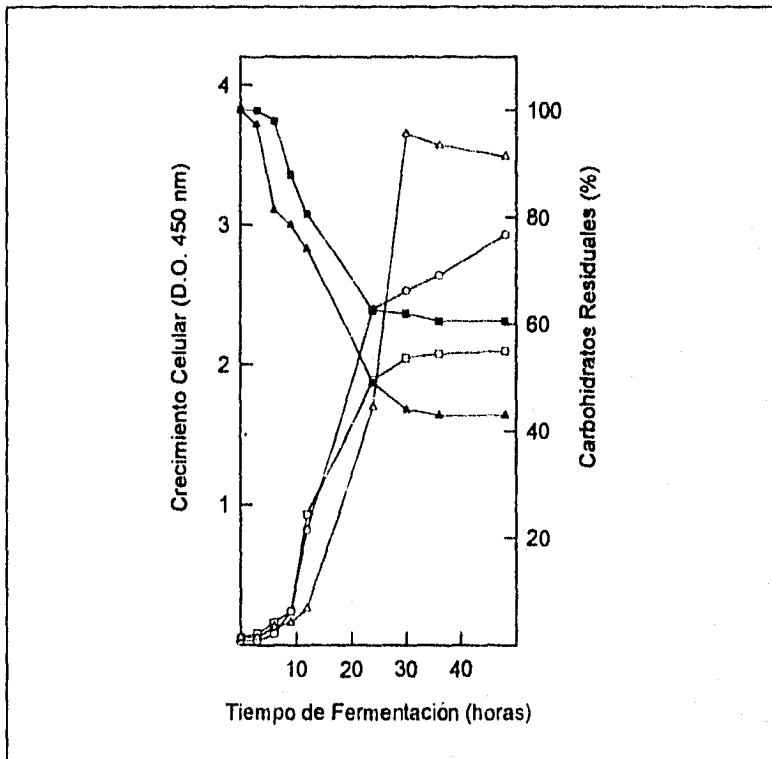


Figura 16. Crecimiento (símbolos abiertos) y consumo de carbohidratos solubles (símbolos cerrados) de *Geotrichum sp.* Carbohidratos solubles (□) carbohidratos solubles+ácido láctico (△); ácido láctico (○)

El crecimiento también aumentó en presencia del ácido láctico en la mezcla de carbohidratos solubles siendo de 3.6 UDO, mientras que en el medio con los carbohidratos solo fué de 2.1 UDO.

Con respecto a la curva de ácido láctico solo, el crecimiento es mayor que en los carbohidratos solos pero menor a la mezcla de carbohidratos+ácido láctico, siendo de 2.5 UDO, lo que hace suponer que el ácido láctico estimula el crecimiento y el consumo de los azúcares solubles.

Kennes en 1991 menciona que en un medio (co-cultivo) de *L. plantarum* y *S. cerevisiae* con glucosa más ácido cítrico, la utilización del citrato por *S. cerevisiae* depende del crecimiento previo de *L. plantarum* en glucosa, menciona que la mezcla glucosa más ácido cítrico aumenta el crecimiento por la habilidad de producir más ATP, con ambas fuentes de carbono. Por lo que para *Geotrichum* en este caso puede estar obteniendo más energía con ambas fuentes de carbono por lo que se ve reflejado en un mayor crecimiento en la Figura 16 con glucosa más el ácido láctico.

Por otro lado, Moon en 1985, reporta que las levaduras y entre ellas ubica al género de *Geotrichum candidum* como tal, pueden crecer a bajos valores de pH y en presencia de ácidos de cadena corta y ácido láctico de ahí la capacidad de poder intervenir en el deterioro de alimentos de pH ácidos y con altas concentraciones de diversos ácidos. Aunque también llega a la conclusión de que estos microorganismos pueden ser inhibidos a altas concentraciones de ácido acético y ácido láctico, esto lo han aplicado para inhibir el crecimiento de algunos hongos en ensilajes.

En el pozol podríamos suponer que el ácido láctico que producen las bacterias lácticas acelera el crecimiento de *Geotrichum* sp. que ha empezado a crecer utilizando trazas de carbohidratos solubles de la masa y probablemente el aceite contenido en la misma. El ácido láctico representa una buena fuente de carbono para el hongo.

Crecimiento de *Geotrichum* sp. en Almidón.

El almidón es el carbohidrato más abundante en la masa nixtamalizada. Con el fin de evaluar que otros componentes de la masa son susceptibles para ser usados además de los carbohidratos solubles, se evaluó el crecimiento de esta cepa usando almidón como fuente de carbono.

Los resultados muestran que el crecimiento es muy pobre en almidón (Figura 17A), siendo de apenas de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína lo que equivale a 0.3 UDO (ver Figura 5 y 6). Esto correlaciona con lo descrito por Durán y cols (1973) quienes reportan que el crecimiento en almidón es del orden de 8 veces menor al obtenido en glucosa. Sin embargo, Nuraida y cols mencionan que cepas aisladas de pozol no hidrolizan ni crecen en almidón (Nuraida, 1995).

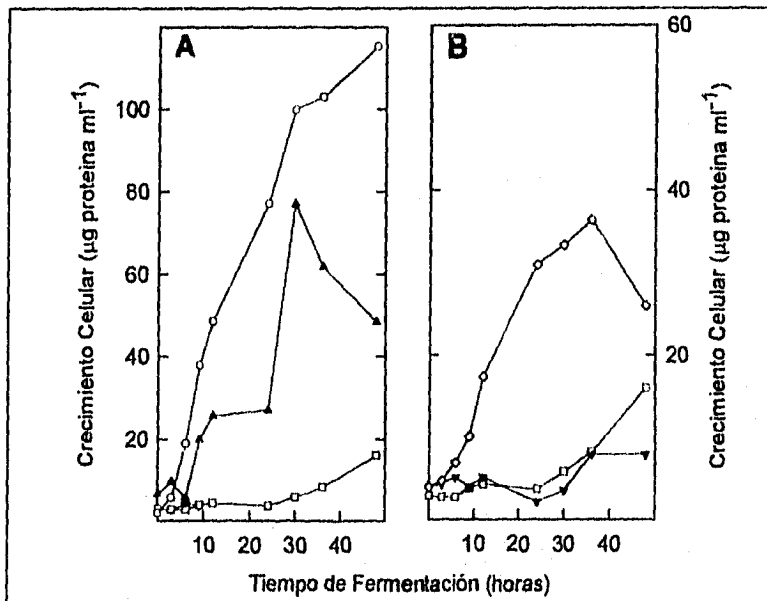


Figura 17. Crecimiento de *Geotrichum* sp. en almidón, (□) evaluado como proteína celular. Fig. 17A Efecto del aceite de maíz en el crecimiento, almidón (□); almidón+aceite de maíz (▲), aceite de maíz (○). Fig. 17B Efecto del ácido láctico en el crecimiento, almidón (□); almidón+ácido láctico (▼), ácido láctico (○).

El crecimiento en almidón también se ve afectado por la presencia de aceite de maíz, aunque a diferencia de los otros casos, el crecimiento es mayor en aceite solo que en la mezcla, siendo de 50 y 190 $\mu\text{g/ml}$ de proteína respectivamente, lo que equivale a 2.5 y 0.5 UDO. Posiblemente en este caso tengamos un efecto negativo del almidón en el transporte, que no permite el aprovechamiento del aceite de maíz.

La gráfica de la figura 17B, corresponde al efecto del ácido láctico en el crecimiento de *Geotrichum* en medio con almidón. Los niveles de crecimiento que se obtienen en las curvas de almidón y almidón+ácido láctico son similares. Mientras en el medio con ácido láctico solo, el crecimiento es mayor,

El almidón no es utilizado por *Geotrichum sp.* para crecer por que no produce amilasas. Ensayos realizados indican que esta cepa no presenta actividad amilolítica. Pero si actividad lipolítica.

Después de analizar los resultados en almidón podemos discutir que en el pozol además de producirse el ácido láctico, también es posible que degrade el almidón por microorganismos antecesores de *Geotrichum sp.* lo cual daría como resultado la producción de glucosa, maltosa, etc., que podrían ser utilizados por el hongo para desarrollarse.

En otros alimentos fermentados de yuca se ha encontrado un fenómeno similar en donde la fermentación se da en dos fases, en la primera se desarrolla la bacteria *Corynebacterium manihot* que ataca el almidón produciendo unidades de glucosa, maltosa, ácidos orgánicos y disminuye el pH. En la segunda fase se desarrolla *Geotrichum candidum* rápidamente por la condición ácida del medio y por los metabolitos antes mencionados. En este alimento el hongo es responsable de la presencia de aldehidos y ésteres que le dan el sabor y aroma al gari (Brian, 1985).

Por otro lado, en estudios recientes se ha encontrado actividad amilolítica en cepas de bacterias lácticas de los géneros: *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Wacher, 1995). Posiblemente éstas, además de producir el ácido láctico

por el metabolismo de los carbohidratos solubles que se encuentran al inicio de la fermentación y de disminuir el pH, liberen unidades de glucosa y maltosa que *Geotrichum* sp. utilice para desarrollarse.

Crecimiento de *Geotrichum* en medios complejos (masa).

Finalmente se hizo crecer a *Geotrichum* sp. en masa de maíz marca "Maseca" en una concentración del 4%. En la figura 18A se observa después de las 30 h hay crecimiento, pero es muy pobre en presencia de masa únicamente, de igual manera en la Figura 18B.

En la mezcla de masa+aceite de maíz de maíz el crecimiento también es menor.

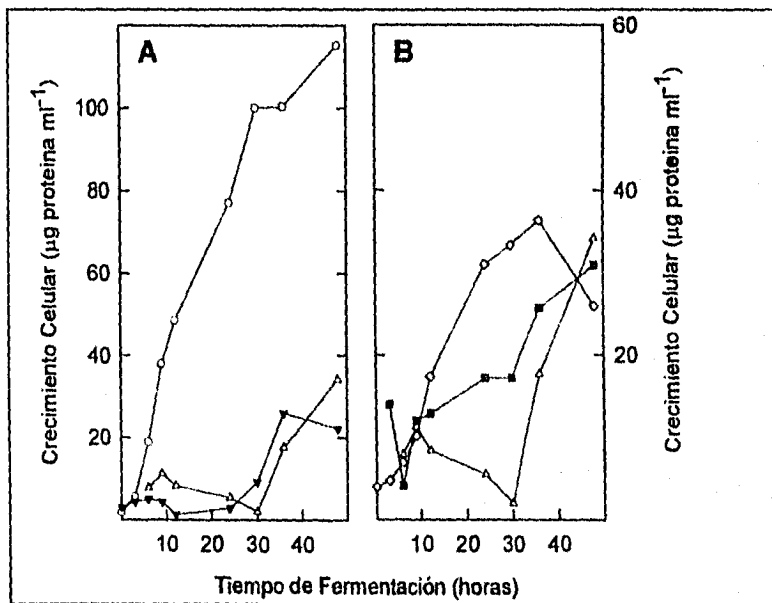


Figura 18. Crecimiento de *Geotrichum* sp. en masa (Δ) evaluado Fig. 18A Efecto del aceite de maíz en el crecimiento de G, con masa (▼); aceite de maíz (○). Fig. 18B Efecto del ácido láctico en el crecimiento de G, con masa (■); ácido láctico (○).

En la Figura 18B no se observa un comportamiento claro en masa+ácido láctico, por lo difícil que resulta las mediciones en masa, ya que la proteína que se midió fue la total, la del microorganismo mas la de la masa, en los calculo se resto el valor de la proteína al tiempo cero.

Determinaciones de Actividad Amilolítica y Lipolítica en Geles de Agar.

En experimentos posteriores se evaluó la presencia de actividad amilolítica y lipolítica en geles de agar utilizando los filtrados libres de células así como muestras liofilizadas, provenientes de medios de cultivo donde se utilizó aceite de maíz, almidón y masa como fuentes de carbono. En ningún caso se detecto actividad amilolítica. Esto puede explicar el pobre crecimiento que se obtiene en almidón ya que *Geotrichum* carece de amilasas para poder degradar este sustrato.

En los medios que contenían aceite de maíz y masa si se detecto un halo hidrólisis de la rodamina para las muestras liofilizadas, siendo en el medio de aceite de maíz más evidente.

De acuerdo a los resultados obtenidos es aparente que *Geotrichum* sp. utiliza bien los monosacáridos, mientras que los y disacáridos los utiliza pobremente y es incapaz de utilizar almidón como fuente de carbono. Puede utilizar eficientemente el ácido láctico y el aceite de maíz, se puede sugerir que el crecimiento de *Geotrichum* sp. durante la fermentación del pozol, se inicia utilizando el aceite de maíz presente en la masa y se acelera una vez que las bacterias lácticas modifican el pH y producen ácido láctico.

CONCLUSIONES

El uso de un medio de cultivo semejante a la masa permitió estudiar el consumo de los carbohidratos: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y almidón por *Geotrichum* sp. aislado de pozol.

Los valores de pH ácidos favorecen el consumo y crecimiento de *Geotrichum* sp. La cepa de *Geotrichum* aislado de pozol indígena demostró tener un mejor crecimiento y consumo de los carbohidratos a pH ácidos 3.5 y 4.7.

Geotrichum sp. utiliza la glucosa y la fructosa hasta un 40%, pero más eficientemente la fructosa, el crecimiento en glucosa y en fructosa se ve favorecido en presencia de aceite de maíz al igual que en fructosa, pero el consumo de estos carbohidratos se mantiene en los mismos niveles.

Geotrichum utiliza pobremente maltosa y sacarosa, pero el aceite de maíz estimula su consumo y el crecimiento del hongo.

El ácido láctico representa una buena fuente de carbono y estimula el crecimiento y el consumo de los carbohidratos.

En almidón crece muy difícilmente debido a su incapacidad de producir amilasas.

En el medio complejo de masa de maíz el crecimiento de *Geotrichum* sp. fue mínimo, posiblemente a la falta de los elementos necesarios para su desarrollo, ya que a la concentración a la que se formuló el medio, los carbohidratos, lípidos y otras fuentes de carbono se encontraban en cantidades muy bajas. Además aun que se hicieron pruebas de concentraciones de masa en los medios para las fermentaciones

en líquido, durante la esterilización sufre cambios importantes en su composición y propiedades físicas.

Geotrichum sp. no produce amilasas extracelulares, por lo que no crece en medio líquido con almidón pero sí produce lipasas, pudiendo crecer en aceite de maíz y en ácido láctico

De estos resultados es evidente que los carbohidratos son utilizados pobremente por *Geotrichum* sp. para crecer ya que utiliza preferentemente aceite de maíz como fuente de carbono y parece estar limitado en la utilización de monómeros, dímeros y en la degradación de almidón.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen. 1981. Nutrition and Health. Feedstuffs. Yearbook Issue.
2. Alvarez Suárez, María Elisa. 1991. Estudio del efecto de algunos parámetros sobre la fermentación láctica y la fijación de nitrógeno en el pozol. Tesis de Maestría. UNAM. México.
3. Aguilera Franco, Delia. 1981. Estudio microbiológico y bioquímico de la fermentación del pozol. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México.
4. Badui, D. S. Química de los Alimentos. Edit. Alhambra Mexicana. México. 1989. 30p.
5. Wood B. J. B. Microbiology of fermented foods. Vol. 1-2. Edit. Elsevier Applied Science Publishers. Great Britain. 1985. 158-171, 279-285, 371 p.
6. Cadwell, I. Y. and Trinci, A. P. J. 1973. Kinetic aspects of growth of *Geotrichum candidum* on various carbon sources. Trans. Br. Mycol. Soc. 61: (3), 411-416.
7. Cañas, A., Wachter, R. C., Barzana, E. 1993. La Elaboración de Pozol en los Altos de Chiapas. Ciencia 44: 219-229.
8. Capparelli, E., & Mata, L. 1975. Microflora of maize prepared as tortillas. Applied Microbiology. 29: 802-806.
9. Carmo-Sousa, 1959. Some physiological properties of *Geotrichum candidum*. Mycologia. 51: 595-598.
10. Castro, Ieso M. 1994. Utilization of Lactic Acid by *Fusarium oxysporum* var. lini: Regulation of Transport and Metabolism. Appl. and Environ. Microbiology. 60: 102-105.
11. Catalal Calvo, M. Tecnología de Cereales. Edit. Acribia. Zaragoza. 1971. 37-55 p.

12. Charton, Enmanuelle and Macrae R. Alasdair. 1993. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC 335426 lipases A and B in hidrolisis and ester synthesis reactions in organis solvents Enzyme Microb. Technol. 15: 489-493.
13. Cordova López, Jesús Antonio. 1994. Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. Tesis de Maestría. UAM. México.
14. Desai, J. D. 1975. Glucose uptake by *Aspergillus nidulans*, purification and properties of glucose binding protein. Experimentia. 31: 160-162.
15. Duran, Angel., Uruburu, F., and Villanueva, J. R. 1973. Morphogenetic and Nutricional studies of *Geotrichum lactis* cells. Arch. Mikrobiol. 88: 245-256.
16. Eck, Andre. El Queso. Edit. Omega. S. A. Barcelona. 1990. 490 pp.
17. Fennema. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Edit. Reverté S. A. Barcelona. 1990. 61, 918 p.
18. Frazier. Microbiología de los Alimentos. edit. Acribia. Madrid. 1985. 16-20, 29 p.
19. Fuentes, I., Herrera, T., and Ulloa, M. 1974. Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas, p. mexicana* y determinación de *Escherichia coli var. neopolitana* aisladas del pozol. Rev. Lat-amer. Microb. 16 p.
20. Gadd, 1989. Nutritinonal Fungi.
21. Giles, Martha. 1995. Estudio sobre las interacciones microbianas importantes para el incremento de proteína durante la fermentación del pozol. Tesis de Licenciatura. Fac. Química, UNAM.
22. Griffin, H David. Fungal Physiology. Edit. John Wiley and Sons. Wiley-Interscience Publication. 1981. New York. 177-179 p. 383 pp.
23. Gobbetti, M., Corsetti, A. and Rossi, J. 1994. The sourdough microflora interactions between latic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 456-460.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

24. González Manrique, Luis M. 1992. Estudio del efecto de la nixtamalización sobre los nutrimentos del maíz sano y contaminado naturalmente. Tesis Profesional. Fac. Química. UNAM. 23-25 p.
25. Guía México Desconocido. 1994. Bedidas Nacionales. Edición Núm. 18. Editorial Jilguero, S. A de C. V.
26. Herrera, T., Ulloa, M. 1970. Aspectos generales sobre la Microbiología del pozol. Rev. Latino-amer. Microbiol. 12: 103-108.
27. Kennes, C., Veiga, M. C. and Dubourguier, H. C. 1991. Tropic relationships between *S. cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. App. Enviromental Microbiology. 57: 1046-1051.
28. Kier, I., Allerma, F. and Sotkjaer, O. 1976. Changes of exponential growth rates inh relation to differentiation of *Geotrichum candidum*. Physiol. Plant. 38: 6-12.
29. Kouser, G., Jaeger, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Enviromental Microbiology. 53: 211-213.
30. Loeza Chávez, Norma Argelia. 1990. Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol. Tesis Profesional. Fac. Química. UNAM. México. 3-5, 22-33 p.
31. Lowry, O., H. Rosebrough, N. J. Fair y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93: 265- 275.
32. Marcelino, N. and Benson, D. 1992. Scanning electron and ligh microscopic study of microbial sucesion on Bethlehem St. Nectaire cheese. Appl. Environ. Microbiol. 58: (1), 3448-3454.
33. Miller, G. I. 1959. Use of dinitrosalicylic acid regent for determination of reducing. Anal. Chem. 31: 426-428.
34. Moon, N. J. 1983. Inhibition of growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propianate and their synergistic mixtures. J. of Appl. Bacteriology. 455-460.

35. Moore-Landecker, Elizabeth. Fundamentals of the Fungi. 3^{ra}. edic. Edit. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. 1990. 231-234 p.
36. Muller, H. G., Nyauko. 1972. Studies of Kenkey a Ghanian. Cereal. Food Journal, Science Food Agric. 23: 544-552.
37. Nuraida, L., Wachter, M. C. and Owens, J. D. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. W. J. of Microbiology and Biotechnology. 11: 567-571.
38. Rodríguez Estrada, Antonio. 1978. Optimización del proceso de nixtamalización para maíz opaco 2. Tesis Profesional. Fac. Química. UNAM. 88 p.
39. Smith, John. Fungal Differentiation. Vol. 4. Edit. Marcel Dekker, Inc. New York. 1983. 358-381, 383-387, 428-435 p.
40. Smith, E. J., Berry, R. D. and Kristiansen, B. The Filamentous Fungi. Vol.1. Industrial Microbiology. Edit. Edward Arnold. 1975. Great Britain. 16-23 p.
41. Sosa Esquivel, Elvía Nohemí. 1970. Compilación bibliográfica sobre la composición química, valor nutritivo y aprovechamiento industrial del maíz. Tesis Profesional. Fac. Química. UNAM.
42. Tablas de Nutricion. Valor Nutritivo de Alimentos Mexicanos. 1980
43. Trinci, A. P. J. 1971. Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. Journal of General Microbiology. 67: 325-344.
44. Trinci, A. P. J. 1971. Exponential growth of the germ tubes of fungal spores. Journal of General Microbiology. 63: 345-348.
45. Trinci, A. P. J. 1972. Culture turbidity as a measure of mould growth. Trans. Br. Mycol. Soc. 67: (3) 463-473.
46. Ulloa, M., and Herrera, T. 1972. Descripción de dos nuevas especies de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Acromobacter pozolis*. Rev. Latinoamer. Microbiol. 14: 15-24.
47. Ulloa, Miguel. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México. Bol. Mex. Mic. Vargas, I. A. 1984. Cuadernos de Nutrición. 4: 18-32.