



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS DEL ATOLE AGRIO DE  
VILLAHERMOSA TABASCO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANITA VALDERRAMA MEMBRILLO**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



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:**      **PROFESOR:** DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

**VOCAL:**            **PROFESOR:** QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

**SECRETARIO:**    **PROFESOR:** QFB. MARTHA GÓMEZ GILES

**1er. SUPLENTE:**   **PROFESOR:** BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

**2° SUPLENTE:**    **PROFESOR:** DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

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

LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

---

**Dra. Ma. del Carmen Wacher Rodarte**

**Asesor del tema**

---

**Dra. Gloria Díaz Ruiz**

**Supervisor del tema**

---

**Anita Valderrama Membrillo**

**Sustentante**

---

---



## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme formar parte de esta maravillosa casa de estudios.

A las Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y Dra. Gloria Díaz Ruiz por permitirme trabajar con ellas, por la confianza que depositaron en mí y por concederme la fortuna de formar parte de la gran familia del laboratorio 324.

Gracias por su paciencia, apoyo y consejos.

A las profesoras Judith Espinosa y Dora Centurión por su apoyo en la realización de la tesis. Gracias por su amabilidad, paciencia y atenciones que tuvieron durante mi estancia en Villahermosa, Tabasco.

A la Biol. Teresa Flores por su paciencia, apoyo y consejos.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 324 del depto. de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química por su apoyo y platicas durante esos días de largo trabajo.

A Karina Esquivel por tu amistad y apoyo incondicional.

Al financiamiento al proyecto de Ciencia Básica CONACYT CB-2008-01 No. 101784 "Metagenómica funcional de alimentos fermentados tradicionales de maíz: Búsqueda de enzimas de interés biotecnológico y estudio de la diversidad microbiana".

---

---



## DEDICATORIAS

A ti niñito hermoso “NIÑOPA” por quererme, acompañarme y siempre hacerme saber que estas a mi lado. Gracias por cuidarme en los momentos difíciles que he pasado, gracias por ayudarme a culminar esta etapa tan importante y bonita de mi vida, gracias Dios.

A ti abuelita Felipa, que aunque ya no estás más conmigo espero que estés muy orgullosa de mi, gracias por mandarme tus bendiciones desde el cielo.

A mi mamita linda muchas gracias por todo el amor y apoyo que me has brindado, por las noches de desvelo, el esfuerzo, dedicación y la paciencia. Eres mi ejemplo de vida, sin duda la mejor madre que Dios me pudo regalar.

A mi papito, gracias por todo tu esfuerzo para sacarme adelante, por el amor y la confianza que me has tenido.

A mi hermano, por quererme tanto, apoyarme y regalarme palabras de aliento en momentos difíciles, siempre contaras conmigo.

A mi tía Leti, por ser una buena amiga, apoyarme incondicionalmente y quererme como una hija, mil gracias.

A David el amor de mi vida, gracias por acompañarme en esta etapa tan linda de mi vida, por todo el amor, la paciencia, el apoyo incondicional, y palabras de aliento que me diste. Fuiste fundamental para que yo terminara la carrera. Gracias por ser mi compañero de vida, te amo.

A mis amigos que me brindaron su apoyo en los momentos malos y buenos, con los que compartí muchos días de trabajo y de felicidad.

---

---



*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.*

*Albert Einstein*

---



---

---

## ÍNDICE

Contenido	Página
Índice general.....	I
Lista de tablas.....	V
Lista de figuras.....	VIII
Resumen.....	X
<b>1.0. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.0. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Alimentos fermentados.....	3
2.2. Alimentos fermentados tradicionales.....	3
2.3. Alimentos fermentados tradicionales de México.....	7
2.3.1. Alimentos fermentados mexicanos elaborados a base de maíz.....	9
2.4. Atoles agrios.....	13
2.4.1. Atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	13
2.5. Composición química del maíz.....	14
2.6. Características generales del almidón.....	16
2.6.1. Amilosa.....	17
2.6.2. Amilopectina.....	17
2.7. Amilasas.....	17
2.8. Microbiología en los alimentos fermentados tradicionales.....	18
2.8.1. Bacterias lácticas en los alimentos fermentados tradicionales.....	19
2.8.2. Bacterias lácticas amilolíticas en los alimentos fermentados tradicionales.....	20
2.9. Bacterias lácticas.....	21



---

	Página
2.9.1. Características.....	23
2.9.2. Metabolismo.....	26
2.10. Identificación de microorganismos.....	29
2.10.1. Pruebas bioquímicas.....	30
2.10.1.1. Galería API 50CH de BioMérieux para la identificación de bacterias lácticas.....	30
<b>3.0. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>4.0. HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.0. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>6.0. METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
6.1. Muestreo del atole agrio.....	35
6.2. Medios de cultivo.....	36
6.3. Materia prima.....	37
6.4. Instrumentos para la elaboración del atole agrio.....	37
6.5. Preparación del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	38
6.5.1. Fermentación sólida.....	40
6.5.2. Fermentación líquida.....	41
6.5.3. Cocción del atole agrio.....	43
6.6. Muestras: agua, maíz después de la molienda, líquido y masa de fermentación	43
6.7. Cuantificación de grupos microbianos en las materias primas y en el atole agrio.....	44
6.7.1. Inoculación de las muestras en los medios de cultivo MRS, MRS-A, ACP, PDA y BRVA.....	44

---



---

	Página
6.7.2. Cuenta en placa de los diferentes grupos microbianos.....	47
6.8. Medición de pH durante la fermentación.....	47
6.9. Aislamiento de bacterias lácticas totales y bacterias lácticas amilolíticas.....	48
6.10. Purificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.....	48
6.11. Conservación de las cepas de las bacterias lácticas.....	49
6.12. Caracterización bioquímica de las bacterias lácticas mediante la galería API 50CH.....	49
<b>7.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
7.1. Recopilación de datos de materias primas y proceso de elaboración del atole agrio.....	52
7.1.1. Atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	52
7.1.2. Materia base: Maíz de dobla.....	52
7.2. Elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.....	53
7.3. Análisis microbiológico.....	56
7.3.1. Cuantificación de grupos microbianos del agua de la Comunidad de Cerro Blanco.....	56
7.3.2. Cuantificación de grupos microbianos del maíz de dobla después de la molienda (masa).....	57
7.3.3. Cuantificación de grupos microbianos en la fermentación líquida del atole agrio.....	57
7.3.4. Cuantificación de grupos microbianos en la fermentación sólida del atole agrio.....	59
7.3.5. Cuantificación de grupos microbianos en el atole agrio después de la cocción.....	63
7.4. Seguimiento de pH-potenciométrico.....	64

---



---

	Página
7.5. Aislamiento de bacterias lácticas y amilolíticas.....	66
7.6. Conservación de las cepas de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.....	69
7.7. Identificación de las cepas lácticas y amilolíticas.....	70
<b>8.0. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>9.0. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>10.0. ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
10.1. Tinción de Gram y prueba de catalasa.....	80
10.1.1. Fundamento de la tinción de Gram.....	80
10.1.2. Técnica de la tinción de Gram.....	81
10.1.3. Fundamento de la prueba de catalasa.....	82
10.1.4. Técnica de la prueba de catalasa.....	82
10.2. Diluciones para el estudio microbiológico del atole agrio.....	83
10.3. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas y amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio.	85
10.4. Medios de cultivo.....	90
<b>11.0. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>



---

---

## LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
2.2.1.	Algunos alimentos fermentados tradicionales a base de maíz.	6
2.3.1.1.	Distribución en México de algunas bebidas fermentadas de maíz.	11
2.3.1.2.	Breve descripción de algunas bebidas fermentadas de México.	12
2.5.1.	Composición promedio del grano de maíz.	15
2.5.2.	Principales azúcares del grano de maíz.	15
2.9.1.1.	Características de las bacterias lácticas.	23
2.9.1.2.	Características diferenciales de bacterias lácticas.	25
6.1.1.	Lugares donde se realizaron los muestreos de la materia prima y de los diferentes tiempos de fermentación.	36
6.2.1.	Grupos microbianos cuantificados en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	37
6.12.1.	Composición de la galería API 50CH BioMérieux.	50
7.3.1.1.	Concentración de microorganismos del agua de manantial que abastece a la Comunidad de Cerro Blanco (UFC/ml).	56
7.3.2.1.	Concentración de microorganismos del maíz recién molido (UFC/g).	57
7.3.3.1.	Concentración de microorganismos en la fermentación líquida (UFC/ml), lote 1.	58
7.3.3.2.	Concentración de microorganismos en la fermentación líquida (UFC/ml), lote 2.	59
7.3.4.1.	Concentración de microorganismos en la fermentación sólida (UFC/g), lote 1.	60
7.3.4.2.	Concentración de microorganismos en la fermentación sólida (UFC/g), lote 2.	60



---

Número	Título	Página
7.3.5.1.	Concentración de microorganismos en el atole agrio de las fermentaciones líquida y sólida después de la cocción (UFC/ml y UFC/g respectivamente).	64
7.7.1.	Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de bacterias lácticas de la fermentación líquida y sólida provenientes del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux a las 48 horas de incubación.	71
7.7.2.	Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas de la fermentación líquida y sólida provenientes del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux a las 48 horas de incubación.	72
7.7.3.	Identificación de bacterias lácticas que provenían de la fermentación líquida del atole agrio mediante sistema API 50CH de BioMérieux.	74
7.7.4.	Identificación de bacterias lácticas que provenían de la fermentación sólida del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.	74
7.7.5.	Identificación de bacterias lácticas amilolíticas que provenían de la fermentación líquida del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.	74
7.7.6.	Identificación de bacterias lácticas amilolíticas que provenían de la fermentación sólida del atole agrio mediante sistema API 50CH de BioMérieux.	74
10.2.1.	Diluciones para el estudio microbiológico de las materias primas, líquido y sólido de fermentación y producto terminado.	83
10.3.1.	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida lote 1 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	85
10.3.2.	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida lote 2 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	86



---

Número	Título	Página
10.3.3.	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida lote 1 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	87
10.3.4.	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida lote 2 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	88
10.3.5	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	89
10.3.6	Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	89



---

---

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
2.5.1.	Grano de maíz.	14
2.9.2.1.	a) Fermentación homoláctica, vía Embden-Meyerhof. b) Fermentación heteroláctica, vía 6-fosfogluconato/ fosfoacetolasa.	28
6.1.	Diagrama de la metodología de trabajo para la caracterización bioquímica de las bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	34
6.5.1.	Mazorcas de maíz para la elaboración del atole agrio.	38
6.5.2.	Desgranado del maíz de dobla para la preparación del atole agrio.	39
6.5.3.	Molienda de los granos del maíz de dobla.	39
6.5.1.1.	Formación de bolas de masa para la fermentación sólida.	40
6.5.1.2.	Fermentación sólida. Se muestran las bolas de masa en recipientes cubiertos con gasa.	41
6.5.2.1.	Homogenización de la masa para la fermentación líquida.	42
6.5.2.2.	Fermentación líquida. Se muestran los recipientes que se usaron para realizar la fermentación, con el sustrato.	42
6.5.3.1.	Producto terminado de la fermentación sólida.	43
6.7.1.1.	Homogenización de las muestras de masa para su análisis microbiológico.	45
6.7.1.2.	Diagrama que muestra el proceso de cuantificación de grupos microbianos en las muestras de atole agrio (fermentación sólida y líquida).	46
6.12.1.	Fermentación de carbohidratos mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.	51



---

Número	Título	Página
7.1.2.1.	Maíz de dobla.	53
7.2.1.	Diagrama de elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	55
7.4.1.	Valores de pH de las diferentes etapas de las fermentaciones sólida y líquida.	65
7.5.1.	Colonias de bacterias lácticas aisladas de la fermentación líquida.	67
7.5.2.	Colonias de bacterias amilolíticas aisladas de la fermentación líquida.	67
7.5.3.	Frecuencia de las características morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	68
7.5.4.	Frecuencia de la morfología microscópica de las bacterias lácticas aisladas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.	69



---

---

## RESUMEN

El atole agrio de Villahermosa, Tabasco es una bebida tradicional mexicana que no ha sido objeto de ningún tipo de investigación, así mismo tampoco se han descrito las etapas de su elaboración. La materia base para elaborar este atole agrio es el maíz, llamado localmente como maíz de dobla, debido a que el tallo de la planta es doblado a la mitad y de esta manera, al quedar unido a la planta está protegido por ella, mientras pierde humedad. De otra forma se tienen pérdidas durante el secado, ya que se separan las mazorcas y en algunas crecen microorganismos. Su proceso de elaboración, que incluye maíz de dobla que no se nixtamaliza podría influir en la microbiota del atole y podría ser diferente a la de otros productos elaborados a partir de maíz.

El objetivo de este trabajo fue conocer las etapas de su elaboración, detectar las concentraciones de grupos microbianos tales como: bacterias lácticas (BAL), bacterias lácticas amilolíticas (BALA), mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes; aislar e identificar en particular las bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas. Finalmente comparar la microbiota encontrada con lo reportado en otros alimentos elaborados a partir de maíz. Para cumplir los objetivos se realizó un muestreo del atole agrio. La elaboración de la bebida se hizo de manera tradicional y se encontró que las etapas de elaboración incluyen: desgranado de las mazorcas, molienda, amasado, fermentación sólida o líquida, eliminación de la cascarilla del maíz y cocción.



---

La investigación incluyó el uso de métodos tradicionales de microbiología. En el atole agrio se detectaron y cuantificaron BAL, BALA, mesófilos aerobios, coliformes y levaduras en diferentes tiempos de fermentación. Dichos grupos microbianos también han sido encontrados en otros alimentos fermentados tradicionales de México como el *pozol*.

En ambos lotes de la fermentación líquida el conteo en placa para todos los grupos microbianos evaluados fue alto, el crecimiento fue masivo y ninguno de los grupos microbianos fue inhibido por la reducción del valor de pH (pH de inicio 6.5 y después de 6 horas disminuyó a 4.05).

Al finalizar 6 horas de fermentación líquida se obtuvo una concentración microbiana (UFC/ml) del orden de  $>10^6$  para BAL y mesófilos,  $>10^5$  para BALA y levaduras y  $>10^4$  para coliformes. No se observó la presencia de mohos.

En la fermentación sólida en general todos los grupos microbianos evaluados crecieron de forma masiva, el conteo en placa fue alto desde el inicio del estudio en ambos lotes. Después de 12 horas de fermentación se obtuvo una concentración microbiana (UFC/g) del orden de  $>10^6$  para BAL y mesófilos,  $>10^5$  para amilolíticas y levaduras y  $>10^4$  para coliformes. No se observó la presencia de mohos. El valor de pH al inicio fue de 6.38 y descendió a 4.46 después de 12 horas de fermentación. Solo la cuenta en placa de coliformes en ambos lotes disminuyó después de 24 horas a  $10^2$  UFC/g cuando el valor de pH era de 4.21.

Se aislaron un total de 72 cepas de bacterias lácticas y 8 cepas de bacterias lácticas amilolíticas Gram (+) y Catalasa (-) de los diferentes tiempos de las



---

fermentaciones sólida y líquida. De acuerdo a las pruebas bioquímicas API 50CH de BioMérieux se identificaron bacterias lácticas de las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

El microorganismo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se identificó en diferentes etapas de la fermentación sólida y líquida desde el inicio hasta el término de estas, de igual forma todas las cepas identificadas como amilolíticas corresponden a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* por lo anterior se asume que su presencia debe ser relevante para el proceso fermentativo, sin embargo, no ha sido reportado como parte de la microbiota láctica en productos fermentados similares.

La bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* aislada e identificada en el atole agrio se presenta de manera frecuente en bebidas que tienen como sustrato al maíz como el *ogi*, *mahewu* y *pozol*.

Al parecer el atole agrio tiene en común microbiota láctica con otros productos fermentados tradicionales que tienen como base al maíz, a pesar de que en el proceso de elaboración se incluye maíz de dobla que no es nixtamalizado.



## 1.0. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados tradicionales son aquéllos en los cuales ocurren cambios microbiológicos/enzimáticos en los sustratos utilizados para su elaboración generándose sabores, aromas y texturas aceptables para los consumidores humanos. Se obtienen mediante fermentaciones naturales, es decir, no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento y están constituidos por microbiotas complejas. Se elaboran a partir de sustratos amiláceos (maíz, sorgo, trigo, etc.) o azucarados (frutas, savia de algunas plantas) y se consumen con diversos fines, pudiendo ser nutricionales, estimulantes, medicinales y/o ceremoniales (Díaz y Wachter, 2003).

En el estado de Tabasco diversos grupos indígenas y mestizos consumen una bebida regional ácida, no alcohólica preparada con una masa elaborada con maíz de dobla, no nixtamalizado y fermentado, que se conoce como atole agrio.

Se le llama localmente maíz de dobla debido a que el tallo de la planta es doblado a la mitad con el fin de que el maíz pierda humedad, evitando la acción de microorganismos. El doblado del tallo se realiza alrededor de treinta días antes de cosechar.

Este atole se elabora únicamente en el periodo de dobla, en los meses de mayo y septiembre. El tipo de maíz (de dobla en vez de uno maduro), sin nixtamalizar y que se puede fermentar sólido o líquido son diferencias que presenta esta bebida con respecto a otras de maíz. Estas particularidades podrían influir en el tipo de



microbiota, por lo que resulta interesante su estudio, en el que además es posible el aislamiento de microorganismos que pudieran usarse en algún proceso biotecnológico. Este trabajo es el primer acercamiento para conocer con mayor detalle las etapas de elaboración del atole agrio así como la microbiota involucrada en el proceso fermentativo, en particular las bacterias lácticas.



## **2.0. ANTECEDENTES**

### **2.1. Alimentos fermentados.**

Los microorganismos ya estaban presentes en la tierra cuando el hombre llegó al planeta. Así, heredó los microbios, las plantas y los procesos microbianos, aunque no tuviera los conceptos de microbiología, química o fermentaciones. Es probable que la fermentación empezó a jugar un papel importante en la dieta del hombre cuando éste comenzó a recolectar alimentos y colocarlos en recipientes. El tipo de estos, a su vez, influyó en el tipo de fermentación que se desarrolló.

Los alimentos fermentados son aquéllos en los cuales ocurren cambios microbiológicos/enzimáticos en los sustratos utilizados para su elaboración generándose sabores, aromas y texturas aceptables para los consumidores humanos. La leche se acidifica naturalmente produciendo leches agrias/yogurts, y si se mantiene por periodos prolongados se convierten en quesos. Los jugos de frutas se fermentan naturalmente y generan vinos, y estos a su vez, si se almacenan en condiciones anaeróbicas se fermentan naturalmente para producir vinagre (Steinkraus, 1993). El uso del mortero y pistilo fue esencial para la producción de algunos alimentos como atoles y pan, que requieren de molienda, pulverización o descascarillado.

### **2.2. Alimentos fermentados tradicionales.**

Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen sin añadir inóculos, por lo que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento y están



constituidos por microbiotas complejas (Díaz y Wacher, 2003). El proceso involucra mezclas de cultivos como hongos, levaduras o bacterias. Estos alimentos son un recurso enorme de microorganismos y algunos de ellos tienen características probióticas. Estos alimentos se han preparado y consumido por cientos de años y están fuertemente asociados a culturas y tradiciones de millones de personas alrededor del mundo, especialmente en comunidades rurales (Tabla 2.2.1). Los alimentos fermentados son componentes importantes de la dieta como alimento básico, complemento de la alimentación básica, condimentos y bebidas (Wacher y Lappe, 1993).

Algunas características benéficas de los alimentos fermentados incluyen (Steinkraus, 1994):

- a) Conservación de una gran cantidad de alimentos debido a la fermentación láctica, acética, alcohólica y/o alcalina.
- b) El crecimiento de microorganismos de descomposición o patógenos se inhibe y los productos se conservan.
- c) El valor nutritivo puede incrementarse, debido al enriquecimiento biológico del alimento con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos orgánicos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- d) La digestibilidad del alimento fermentado generalmente se mejora en comparación con el sustrato del cual se parte.
- e) Detoxificación durante el proceso fermentativo.
- f) Disminución en los requerimientos energéticos y tiempos de cocción.



g) Enriquecimiento de la dieta a través del desarrollo de una diversidad de sabores, aromas y texturas en sustratos de alimentos.

La mayoría de los alimentos fermentados se producen a nivel artesanal, mientras que un número considerable de procesos de alimentos fermentados se han escalado a nivel industrial con fines comerciales.

Las fermentaciones han sido utilizadas por siglos y en muchos países para conservar y mejorar la calidad de los alimentos básicos, pero muy pocas naciones han llegado a producir versiones industriales de sus fermentaciones étnicas. Por ejemplo, en Europa las fermentaciones de los productos lácteos han evolucionado desde las recetas tradicionales hasta los procedimientos sofisticados que requieren aislamiento y propagación de cultivos microbianos especializados, llamados iniciadores los cuales han sido clasificados y mejorados usando técnicas de microbiología y de biología molecular (Hoschke *et al.*, 1984).



**Tabla 2.2.1. Algunos alimentos fermentados tradicionales a base de maíz.**  
**(Modificado de Nout et al., 2007)**

Producto	País (es) y/o área (s)	Sustratos	Microbiota funcional	Tipo de fermentación	Descripción
Banku	Egipto	Maíz o yuca	LAB, Levaduras	FSS, N	Bola de masa
Busaa	Kenia, Uganda	Maíz, mijo africano	LAB, Levaduras	SmF, N	Bebida alcohólica ácida
Chicha	Sudamérica	Maíz	LAB, mohos, levaduras, bacterias acéticas	SmF, N	Bebida alcohólica ácida, efervescente, translúcida amarillenta
Kenkey	Ghana	Maíz	LAB, Levaduras	SSF, N	Bola de masa, cocida
Mahewu	Sudáfrica	Maíz	LAB	SmF, N	Bebida no alcohólica, ácida
Mawé	Benin, Congo	Maíz	LAB, Levaduras	SSF, N	Masa ácida convertida en atole o molida
Munkoyo	Zambia, Zaire	Maíz	LAB, Levaduras	SmF, N	Bebida alcohólica dulce, ácida
Ogi	Nigeria, Oeste África	Maíz, sorgo o mijo	LAB, bacterias acéticas, mohos y levaduras	SmF, N	Hojuelas ácidas
Poto-poto	Congo	Maíz	LAB, Levaduras	SSF, N	Bolas de masa ácidas convertidas en atole u hojuelas
Pozol	México	Nixtamal	LAB, otras bacterias, mohos, levaduras	SSF, N	Bolas diluidas con agua para hacer un atole ácido no alcohólico

LAB Bacterias ácido lácticas; FSS Fermentación semisólida; SmF Fermentación sumergida; N Fermentación Natural



### **2.3. Alimentos fermentados tradicionales de México.**

A pesar de que en su mayoría son poco conocidos, tienen importancia alimentaria, social y económica para los grupos étnicos que regularmente los preparan y consumen, se trata de productos locales elaborados mediante métodos de fermentación transmitidos de generación en generación hasta la actualidad. Se elaboran a partir de sustratos amiláceos (maíz, sorgo, trigo, etc.) o azucarados (frutas, savia de algunas plantas etc.) y se consumen con diversos fines, pudiendo ser nutricionales, estimulantes, medicinales y/o ceremoniales. En la actualidad de toda la variedad de bebidas y alimentos fermentados existentes en nuestro país, sólo algunos han sido objeto de investigaciones étnicas, antropológicas, sociales, microbiológicas y químicas (Herrera, 1993).

Las bebidas y los alimentos fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de grupos indígenas de México desde la época prehispánica de manera que la tradición de su consumo ha continuado hasta la época actual, no solo por los grupos étnicos, pues en mayor o en menor grado, los grupos mestizos y en forma más restringida, los criollos y los de inmigración reciente aceptan esporádicamente algunos productos fermentados, por el contrario de los indígenas que llegan a consumir algunos de ellos como parte de su alimentación cotidiana (Herrera, 1993).

Las bebidas y los alimentos fermentados mexicanos pueden ser clasificados de acuerdo con las materias primas que se utilizan en su preparación y con base en su composición química. En términos generales, puede hacerse una clara



distinción entre los productos fermentados alcohólicos y los no alcohólicos; siguiendo otro enfoque estos pueden ser divididos en dos grupos: autóctonos o indígenas y alóctonos o de origen extranjero, aunque esta clasificación no siempre está bien delimitada porque existen varias modalidades en ambos tipos, de manera que es posible considerar bebidas y alimentos fermentados distintos a los originales o de tipo mixto, especialmente elaborados por poblaciones mestizas, a menudo con características intermedias entre los tipos indígenas y los introducidos.

Entre las bebidas y los alimentos alcohólicos autóctonos de México los siguientes son algunos de los más apreciados: pulque, tepache, colonche, tesgüino y balché; por otra parte, entre los no alcohólicos de origen prehispánico, el pozol es el más importante (Herrera, 1993).

En México se elaboran actualmente o se preparaban en épocas pasadas, mediante procesos de fermentación, numerosos alimentos bebidas, tanto autóctonos como alóctonos, aunque solo algunos como los mencionados anteriormente han llegado a alcanzar una gran aceptación en zonas amplias del país, pues muchos de estos están restringidos a pequeñas extensiones territoriales en relación a factores ecológicos y a las predilecciones de determinados grupos étnicos por ciertos alimentos, cuyo consumo se vuelve rutinario y llega a ser tradicional.



---

---

### 2.3.1. Alimentos fermentados mexicanos elaborados a base de maíz.

Mesoamérica es una de las principales regiones para el desarrollo histórico de la agricultura mundial. Entre las diversas plantas domesticadas en esa región, se destaca al maíz, que ha formado parte sustancial de la dieta local desde hace varios milenios. La tecnología indígena del maíz ha evolucionado de un estilo artesanal hasta una industria moderna que usa las recetas antiguas pero con procedimientos mecanizados y de esta manera ha logrado preservar sus ventajas de gran valor nutritivo. De primordial importancia es el uso de la llamada técnica de elaborar el “nixtamal” o masa cocida de maíz, cuya etimología náhuatl (*nixte* = ceniza, *tamalli* = masa cocida) denota su antigüedad y origen. Esta tecnología conservó el cocimiento alcalino que ha sido encontrado muy ventajoso porque texturiza la masa, aumenta la concentración de calcio, aumenta la digestibilidad, mejora el balance isoleucina/leucina, libera parte de la niacina que no está biodisponible inicialmente en el grano y promueve una mejor asimilación de las vitaminas (Viniegra, 1993).

A pesar de estas ventajas de la tecnología del nixtamal, es muy sabido que la proteína del maíz es deficiente en lisina y triptófano pero afortunadamente se puede complementar con la proteína de los frijoles comunes. Pero, otra alternativa tradicional para mejorar la calidad de la proteína del maíz, es la fermentación láctica, ya que puede transformar parte de la proteína vegetal en biomasa microbiana con alto contenido de lisina y triptófano (Erdman *et al.*, 1977).



Otras fermentaciones indígenas del maíz, alcohólicas y no alcohólicas, han sido examinadas por Cruz-Ulloa y Ulloa (1973) su distribución aproximada en México se muestra en la Tabla 2.3.1.1. Estos autores han indicado que 24 grupos étnicos tienen sus propios procesos de fermentación y cerca de la mitad de los procesos son no alcohólicos (probablemente lácticos).

La recopilación del Museo Nacional de las culturas Populares (1982) indica la preservación de una gran variedad de fermentaciones indígenas del maíz, a pesar de la fuerte competencia de las bebidas industrializadas de origen extranjero. Se incluyen en la lista productos con nombres tales como *chicha*, *chilote*, *elisquiate*, *mejengue*, *piznate*, *pozol*, *te rico* y *tesgüino*, se indica brevemente sus recetas tradicionales (Tabla 2.3.1.2). Por lo tanto, a pesar de la fuerte competencia industrial, las fermentaciones indígenas del maíz aún ofrecen la posibilidad de ser rescatadas y convertirse en alternativas novedosas para la dieta mexicana, en espera de ser redescubiertas y reinventadas para usos modernos en la dieta de la población urbana (Viniestra, 1993).



**Tabla 2.3.1.1 Distribución en México de algunas bebidas fermentadas de maíz\***

<b>A. BEBIDAS ALCOHÓLICAS</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>ESTADOS</b>	<b>GRUPOS ÉTNICOS</b>
<i>Sendenchó</i>	México, Michoacán	Mazahuas
<i>Tepache</i>	Sonora, Oaxaca	Pápagos, Triques, Mixtecos, Amuzgos, Chinantecos
<i>Tesgüino</i>	Oaxaca, Sonora, Chihuahua, Nayarit, Jalisco, Durango	Zapotecos, Pimas, Yaquis, Tarahumaras, Tepehuanos, Huicholes.

<b>B. BEBIDAS NO-ALCOHÓLICAS</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>ESTADOS</b>	<b>GRUPOS ÉTNICOS</b>
<i>Agua agria</i>	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, D.F.	Nahuas
<i>Atole</i>	Guanajuato	Chichimeca-jonaz
<i>Atole agrio</i>	Oaxaca	Mazatecos
<i>Pozol</i>	Chiapas, Yucatán, Tabasco	Zoques, Lacandones, Mayas, Tzotziles, Tojolabales, Chontales

\*Datos compilados por Cruz-Ulloa (1973).



**Tabla 2.3.1.2 Breve descripción de algunas bebidas fermentadas de México\***

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
<i>Chicha</i>	Los granos se cuecen y fermentan. Se puede añadir azúcar de caña
<i>Chilote</i>	Los granos de maíz se muelen con miel y azúcar de caña. La mezcla se cuece y se fermenta.
<i>Elisquiote</i>	Los granos de maíz se remojan, muelen y se mezclan con panela y chile.
<i>Mejenge</i>	El grano se mezcla con hojas de maíz, panela, agua y pulque. La fermentación dura 3 días. Se añaden rebanadas de plátano y piñas con canela. Se permite otro día de fermentación
<i>Piznate</i>	El maíz se tuesta, muele y se mezcla con agua, piloncillo y canela. Se consume después de 2 o 3 días de fermentación.
<i>Pozol</i>	Los granos remojados se hierven con cal hasta que se desprenden la cutícula y se ablandan. Se muelen y la masa se deja fermentar para después diluirse con agua y mezclarse con azúcar y especias (vainilla, canela, etc.)
<i>Te rico</i>	Se muelen las tortillas tostadas y se mezclan con agua, azúcar o miel, canela u hojas de limón.
<i>Tesgüino</i>	Los granos se germinan por 9 días. La malta se muele y se hierven por 10 horas. Se consume después de fermentarse con azúcar

\*Datos compilados por el Museo de Culturas Populares (1982).



---

---

## **2.4. Atoles agrios.**

Los atoles se preparan con masa o maíz agriado y representan uno de los tantos productos que se elaboran con masa de maíz con o sin el proceso de nixtamalización. En sus diversas modalidades son muy apreciados en algunas partes del centro y sur de México (Herrera, 1993).

Uno de los atoles agrios mexicanos que ha sido objeto de estudio es el *Axocotl*, consumido por los náhuatl del municipio de Cuetzalan, Puebla. Se trata de una bebida agria no embriagante de color verdoso, preparada con maíz hecho masa y nixtamalizado, fermentado de 3-4 días. El *Axocotl* es de color verdoso debido a que el fermentado de maíz se mezcla con una hierba conocida como “la hierba del axocot” la cual le da un sabor dulce al preparado (Guadarrama, 2007)

### **2.4.1. Atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

En el estado de Tabasco diversos grupos indígenas y mestizos consumen una bebida regional ácida, no alcohólica preparada con masa de maíz de dobla, no nixtamalizado y fermentado, que se conoce como atole agrio.

La materia base para elaborar este atole es el maíz, llamado localmente como maíz de dobla. El atole agrio se elabora únicamente en el periodo de dobla, en los meses de mayo y septiembre. Este atole se puede adicionar de azúcar. Tradicionalmente, es consumido por mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree que este aumenta la cantidad de leche que se produce, así mismo los habitantes de la comunidad le atribuyen una mejora a la salud cuando se padece de diarrea. También es

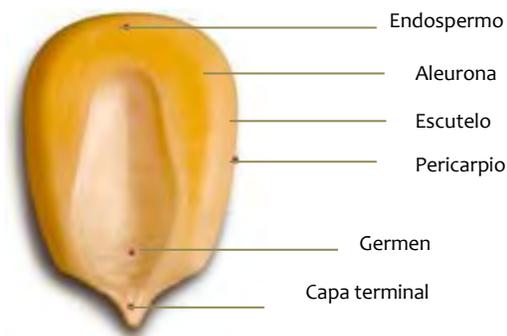


preparado para la celebración del día de Muertos para colocarlo en las ofrendas dedicadas a los difuntos que disfrutaban de esta bebida.

## 2.5. Composición química del maíz.

El maíz es una de las plantas más útiles al hombre. Una de las principales características es su gran adaptación en suelos y climas muy diversos. La composición química es variable y está relacionada con: estadio, raza, variedad, tecnología de cultivo y clima (Reyes, 1990).

El grano de maíz (Figura 2.5.1.) está constituido por: pericarpio, aleurona, endospermo, escutelo, embrión o germen y capa terminal. El endospermo conforma el 82% del grano; el pericarpio el 6% y el germen el 12%.



**Figura 2.5.1. Grano de maíz (Reyes, 1990).**

La composición química promedio de la materia seca del grano entero, se presenta en la Tabla 2.5.1.



**Tabla 2.5.1. Composición promedio del grano de maíz (Reyes, 1990).**

Componente	Por ciento
Almidón	72.40
Grasa (aceite)	4.70
Proteína	9.60
Cenizas	1.43
Azúcares	1.94
Fibra	9.93

Durante el desarrollo del grano de maíz se sintetizan los polímeros estructurales y de almacenamiento así como una variedad de carbohidratos simples (Tabla 2.5.2.). Los carbohidratos del maíz están distribuidos entre muchos tejidos del grano. El mayor carbohidrato constituyente de todo el grano es el almidón con un 72% de peso seco, mientras que los carbohidratos sencillos como D-fructosa y D-glucosa generalmente se encuentran en niveles bajos. La sacarosa es el disacárido que se encuentra en mayor concentración en el grano de maíz, seguido por niveles bajos de maltosa. Algunos trisacáridos y oligosacáridos son constituyentes menores del grano de maíz; se han reportado niveles bajos del trisacárido rafinosa. El sorbitol se encuentra en algunas variedades de maíz dulce (Boyer y Shannon, 1987).

**Tabla 2.5.2. Principales azúcares del grano de maíz (Boyer y Shannon, 1987).**

Monosacáridos	Glucosa Fructosa
Disacáridos y trisacáridos	Sacarosa Maltosa Rafinosa Maltotriosa
Azúcares-alcohol	Sorbitol myo-inositol Fitato
Carbohidratos complejos	Almidón Hemicelulosa Celulosa Lignina



Muchos polisacáridos tienen un papel importante en la estructura de los granos de maíz. Estos se pueden clasificar como sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosas. Se ha encontrado que el pericarpio de maíz está compuesto de 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina con base a peso seco. Las fibras de celulosa son la unidad estructural básica de la pared celular y están asociadas con otros polisacáridos de la pared celular primaria y secundaria; estos polímeros contienen varios azúcares, incluyendo glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y manosa (Boyer y Shannon, 1987).

## **2.6. Características generales del almidón.**

El almidón se encuentra en los granos de los cereales en forma de gránulos y está ampliamente distribuido en los más diversos órganos de las plantas como carbohidratos de reserva que se produce a través de la fotosíntesis en las plantas. Es un componente importante de diversos alimentos y la fuente más importante de carbohidratos de la alimentación humana. Las fuentes más importantes de almidón son los cereales (40 a 90% de su peso seco) y tubérculos (65 a 85%).

El almidón es una mezcla de dos glucanos, amilosa y amilopectina. En términos generales, los almidones contienen aproximadamente 17-27 % de amilosa y el resto es amilopectina. Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría debido a que su estructura está altamente organizada y a que presentan estabilidad debido a las múltiples interacciones que existen con sus dos moléculas constituyentes amilosa y amilopectina (Badui, 2006; Dendy y Bogdan, 2001 y Hosney, 1991).



---

---

### **2.6.1. Amilosa.**

La amilosa es una larga cadena lineal formada por monómeros de glucosa unidos entre sí por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. Tienen la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa; capaces de incluir a otras moléculas como ácidos grasos, así mismo esta fracción es la responsable de la coloración azul que presenta el almidón con el yodo ya que la molécula hidratada atrapa a las moléculas de yodo. Generalmente insolubles o poco solubles en agua y sólo se solubilizan mediante el uso de condiciones más o menos drásticas, por ejemplo con altas temperaturas o por ruptura de los puentes de hidrógeno con reactivos adecuados como bases fuertes (Badui, 2006; Dendy y Bogdan, 2001).

### **2.6.2. Amilopectina.**

Por otra parte la amilopectina es la parte ramificada del almidón, formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 en las partes lineales y  $\alpha$ -1,6 en las partes ramificadas. Como promedio existe una ramificación cada 15-30 restos de glucosa. Presenta color café frente a una solución de yodo (Badui, 2006; Dendy y Bogdan, 2001).

### **2.7. Amilasas.**

Las enzimas capaces de hidrolizar las uniones  $\alpha$ -glucosídicas del almidón se denominan enzimas amilolíticas o  $\alpha$ -glucanasas y son producidas por animales, plantas y microorganismos. Diversas enzimas amilolíticas hidrolizan el almidón o sus productos de degradación. Las acciones de estas enzimas pueden dividirse en



---

---

dos categorías. Las endoamilasas, que rompen uniones al azar en el interior de la molécula de almidón y las exoenzimas, que hidrolizan a partir del extremo no reductor, produciendo productos pequeños. Se puede distinguir otra división de las amilasas, de acuerdo con los enlaces que las enzimas son capaces de degradar, por ejemplo, las enzimas desramificantes pueden hidrolizar uniones  $\alpha$ -1,6. La  $\alpha$ -amilasa es una endoenzima que hidroliza enlaces internos  $\alpha$ -1,4 y que puede saltarse las uniones-1,6. La  $\beta$ -amilasa es una exoenzima que libera maltosa hidrolizando uniones-1,4 a partir del extremo no reductor, no puede saltarse los enlaces-1,6 por lo que siempre habrá dextrinas. La glucoamilasa produce glucosa y puede degradar tanto enlaces 1,4 como 1,6 (Vihinen y Mäntsälä, 1989).

Una variedad de levaduras, hongos y bacterias son capaces de degradar al almidón por la formación de enzimas extracelulares amilolíticas (Antranikian, 1990).

## **2.8. Microbiología en los alimentos fermentados tradicionales.**

La microbiología de muchos de estos productos es complicada y no conocida. En la mayoría de estos productos la fermentación es natural e involucra cultivos mixtos de levaduras, bacterias y hongos. Algunos microorganismos pueden participar paralelamente, mientras otros actúan secuencialmente cambiando la microbiota dominante durante el transcurso de la fermentación. Las especies de bacterias más comunes de la fermentación son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y *Bacillus*. Entre los hongos se encuentran: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y



---

---

*Trichothecium*; las levaduras más comunes son las especies del género *Saccharomyces*. (Blandino *et al.*, 2003).

### **2.8.1. Bacterias lácticas en los alimentos fermentados tradicionales.**

En México una de las bebidas fermentadas tradicionales que más se ha estudiado es el *pozol*, es una bebida ácida no alcohólica, resultante de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado (Ulloa *et al.*, 1987).

Estudios realizados (Wacher *et al.*, 2000) demuestran que el *pozol* cuenta con una microbiota compleja conformada por hongos, levaduras y bacterias de diferentes tipos, siendo las bacterias lácticas las más abundantes durante la fermentación de la masa de maíz. Mediante técnicas tradicionales de microbiología se identificaron a bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactococcus* sp. Posteriormente haciendo usos de técnicas moleculares como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) Ampe *et al.*, 1999 se corroboró que las bacterias lácticas constituyen la microbiota predominante en el *pozol*, ya que representaron del 90 al 97% de la microbiota activa de la masa de maíz fermentada, así mismo se encontró que los miembros del género *Streptococcus* representaron del 25 al 50% de la microbiota y que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, junto con los miembros de los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*, fueron los organismos dominantes durante la fermentación.

Los estudios realizados por Ampe y Miambi (2000), en las comunidades bacterianas de los alimentos fermentados de maíz (*pozol*, *poto poto* y *ogi*) de



---

---

México, Congo y Benin mediante el uso de la técnica de DGGE mostraron que, el pozol tiene una mayor diversidad microbiana. En los tres alimentos fermentados de maíz encontraron la presencia de especies de bacterias lácticas tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*. La omnipresencia de estas bacterias sugirió que se trata de especies importantes en la fermentación del maíz. La distribución de cepas de *Lactobacillus plantarum* en los alimentos vegetales fermentados ha sido bien documentada (Daeschel *et al.*, 1987). Por el contrario, el papel ecológico de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii* en la fermentación de material vegetal no se conoce. Sus resultados sugirieron que estas especies están muy extendidas entre las fermentaciones tradicionales del maíz en los países tropicales.

En el atole agrio *Axocotl* de Cuetzalan, Puebla (bebida agria no alcohólica, hecha de masa de maíz nixtamalizado, adicionada de una hierba dulce) se realizó un estudio microbiológico mediante el análisis de la restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) y se encontraron *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus plantarum* (Guadarrama, 2007).

### **2.8.2. Bacterias lácticas amilolíticas en alimentos fermentados tradicionales.**

Se han aislado diversas bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA) de diferentes alimentos fermentados tropicales elaborados con materias amiláceas, principalmente de yuca y cereales (por ejemplo, maíz y sorgo). Cepas de *Lactobacillus plantarum* han sido aisladas de productos a base de yuca fermentada en África (Nwankwo *et al.*, 1989).



---

---

Cepas amilolíticas de *Lactobacillus fermentum* se aislaron por primera vez en Benín, de una masa fermentada de maíz (*ogi* y *mawe*) por Agati *et al.* (1998). Sanni *et al.*, (2002) describió cepas amilolíticas de *L. plantarum* y *L. fermentum* en varios alimentos amiláceos fermentados tradicionales de Nigeria. La forma en que la materia prima es procesada puede determinar la composición de la microbiota y, en particular, la aparición de las bacterias lácticas amilolíticas (Guyot *et al.*, 2000). Debido a la capacidad de sus  $\alpha$ -amilasas de hidrolizar parcialmente el almidón crudo (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000), BALA pueden fermentar diferentes tipos de material amiláceo, como el maíz (Nakamura, 1981), papa (Chatterjee *et al.*, 1997), o la yuca (Giraud *et al.*, 1991) entre otros. Estudios realizados por Díaz *et al.*, 2003 determinaron que *Streptococcus bovis* (actualmente *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*) es la especie dominante entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas del *pozol*.

## **2.9. Bacterias lácticas.**

El concepto bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo de organismos se desarrollo a inicios del año 1900, precedida por científicos pioneros y la evolución técnica durante la última parte del siglo XIX. Las interacciones de las BAL en los alimentos llamaron la atención de los científicos y dio lugar a la contribución significativa de Pasteur sobre la fermentación ácido-láctica en 1857, quién estudió los procesos fermentativos y demostró que se deben a la presencia de microorganismos. Seguido del primer aislamiento de un cultivo bacteriano puro, *Bacterium lactis*, por Lister en 1873 (Stiles y Holzapfel, 1997). BAL son típicas en



---

---

un gran número de fermentaciones espontáneas en los alimentos, pero también están estrechamente asociadas con el ser humano y el ambiente (Stiles y Holzapfel, 1997). Como resultado de su extremada especialización fisiológica, las bacterias lácticas están confinadas a unos cuantos ambientes naturales característicos. Algunas viven en asociación con plantas y crecen a expensas de los nutrientes liberados tras la muerte y descomposición de los tejidos vegetales. Se encuentran en alimentos y bebidas preparadas a partir de materiales vegetales: encurtidos, col ácida, pienso ensilado, vino y cerveza (Stanier, 1992).

Otras bacterias lácticas constituyen parte de la microbiota normal del cuerpo de un animal y se encuentran en un número considerable en la nasofaringe, el tracto intestinal y la vagina de mamíferos (Stanier *et al.*, 1992).

Las primeras definiciones de bacterias ácido lácticas como grupo se basaron en la capacidad para fermentar y coagular la leche incluidas las bacterias coliformes. La descripción de *Lactobacillus* por Beijerinck en 1901 como bacterias Gram-positivas separó a los coliformes de las BAL. De acuerdo con Orla-Jensen en 1919 “las bacterias verdaderas ácido lácticas” forman un grupo natural de bacterias Gram-positivas, inmóviles, no formadoras de esporas, con forma de cocos, y que fermentan hidratos de carbono y alcoholes superiores para formar ácido láctico principalmente (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos que comparten características fisiológicas, metabólicas y morfológicas. Históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el centro del grupo; aunque también se sugieren como bacterias lácticas:



---

---

*Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las BAL forman un grupo diverso de microorganismos, las de importancia en los alimentos pertenecen a los géneros: *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997).

### **2.9.1. Características.**

En general las bacterias lácticas cuentan con las características que se muestran en la tabla 2.9.1.1

**Tabla 2.9.1.1. Características de las bacterias lácticas (Carr et al., 2002).**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Gram-positivas</li><li>▪ Aerobias facultativas o anaerobias</li><li>▪ No esporuladas</li><li>▪ Morfología de cocos o de bacilos</li><li>▪ Oxidasa, catalasa y bencidina negativo debido a la falta de citocromos y porfirinas</li><li>▪ No reducen nitratos a nitritos</li><li>▪ No utilizan como sustrato el lactato</li><li>▪ Formación de isómeros D, L y DL del ácido láctico</li></ul> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

La clasificación en diversos géneros de bacterias lácticas, se basa en gran medida en la morfología, el tipo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diversas



temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad para crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a la acidez o alcalinidad como se muestra en la tabla 2.9.1.2 (Carr *et al.*, 2002). En cuanto a los nutrientes para su crecimiento, requieren de una fuente de carbono para extraer la energía necesaria para su metabolismo (hidratos de carbono tales como, azúcares y almidón), así como el nitrógeno, el fósforo y el azufre, los cuales se incorporan a las moléculas estructurales de la célula.

Los medios de cultivo para estas bacterias generalmente deben contener nitrógeno bajo la forma de nitrógeno proteico (extracto de levadura) los otros dos elementos importantes se incluyen como sales de fosfato y sulfato respectivamente, y una serie de micronutrientes (vitaminas, hierro cobalto, cobre, zinc, etc.) (Mönckeberg, 1988). Aun creciendo en medios muy ricos, las colonias de las bacterias del ácido láctico siempre son relativamente pequeñas de 2-3 mm, casi nunca están pigmentadas; como resultado de la ausencia de citocromos la colonia tiene un aspecto blanco color yeso, muy característico. El tamaño pequeño de las colonias es atribuible, en primer lugar a los bajos rendimientos del crecimiento, consecuencia de su metabolismo exclusivamente fermentativo (Stainer *et al.*, 1992). El crecimiento y las características morfológicas se basan en las propiedades de crecimiento en un medio sólido o líquido (color, textura y forma de las colonias) o al ser teñidas mediante tinción de Gram. Las BAL pueden crecer a temperaturas de 5 a 45°C, la mayoría de las cepas son capaces de crecer a un pH de 4.4. El crecimiento es óptimo de 5.5-6.5 (Gopal *et al.*, 2008).



**Tabla 2.9.1.2. Características diferenciales de bacterias ácido lácticas (Carr et al., 2002).**

CARACTERÍSTICAS	BACILOS			COCOS					
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Fermentación	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Homo	Homo	Homo	Hetero
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento a 6.5% NaCl	ND <sup>a</sup>	±	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento a 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Acido láctico <sup>b</sup>	L	D, L, DL <sup>c</sup>	L	L	D	L, DL <sup>c</sup>	L	L	D, DL <sup>c</sup>
Formación de tétradas	-	-	-	-	-	+	-	+	-

+ = positiva; - = negativa; ± = varía entre especies; <sup>a</sup> = no determinado; <sup>b</sup> = configuración del ácido láctico producido por la glucosa; <sup>c</sup> = Producción de ácido láctico varía entre especies.



### 2.9.2. Metabolismo.

Hacia 1920, Orla-Jensen señaló que las bacterias lácticas podían dividirse en dos subgrupos bioquímicos, que se distinguen por los productos formados a partir de la glucosa. Las BAL que llevan a cabo una fermentación homoláctica (homofermentadoras) obtienen como producto principal ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa, vía Embden–Meyerhof. Estas bacterias poseen la enzima aldosa y por ello son capaces de fermentar la glucosa de manera más directa al ácido láctico (Figura 2.9.2.1.).

Por otro lado las BAL que realizan una fermentación heteroláctica (heterofermentadoras) no sólo producen ácido láctico sino también, dióxido de carbono, etanol y ácido acético, vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa. Las BAL heterofermentadoras carecen de la enzima aldosa por lo que efectúan una conversión a la molécula de glucosa (6 carbonos) a una pentosa (5 carbonos) (Figura 2.9.2.1.) (Stanier *et al.*, 1992 y Carr *et al.*, 2002).

La característica esencial del metabolismo de las BAL es la fermentación eficiente de carbohidratos acoplada a la fosforilación a nivel sustrato debido a la carencia de compuestos porfirínicos (porfirinas y citocromos). El ATP generado es subsecuentemente utilizado para propósitos biosintéticos. Las bacterias ácido lácticas son un grupo que presentan una enorme capacidad de degradar diferentes carbohidratos y compuestos relacionados, produciendo energía solo por la fermentación de azúcares (Axelsson, 1994).



---

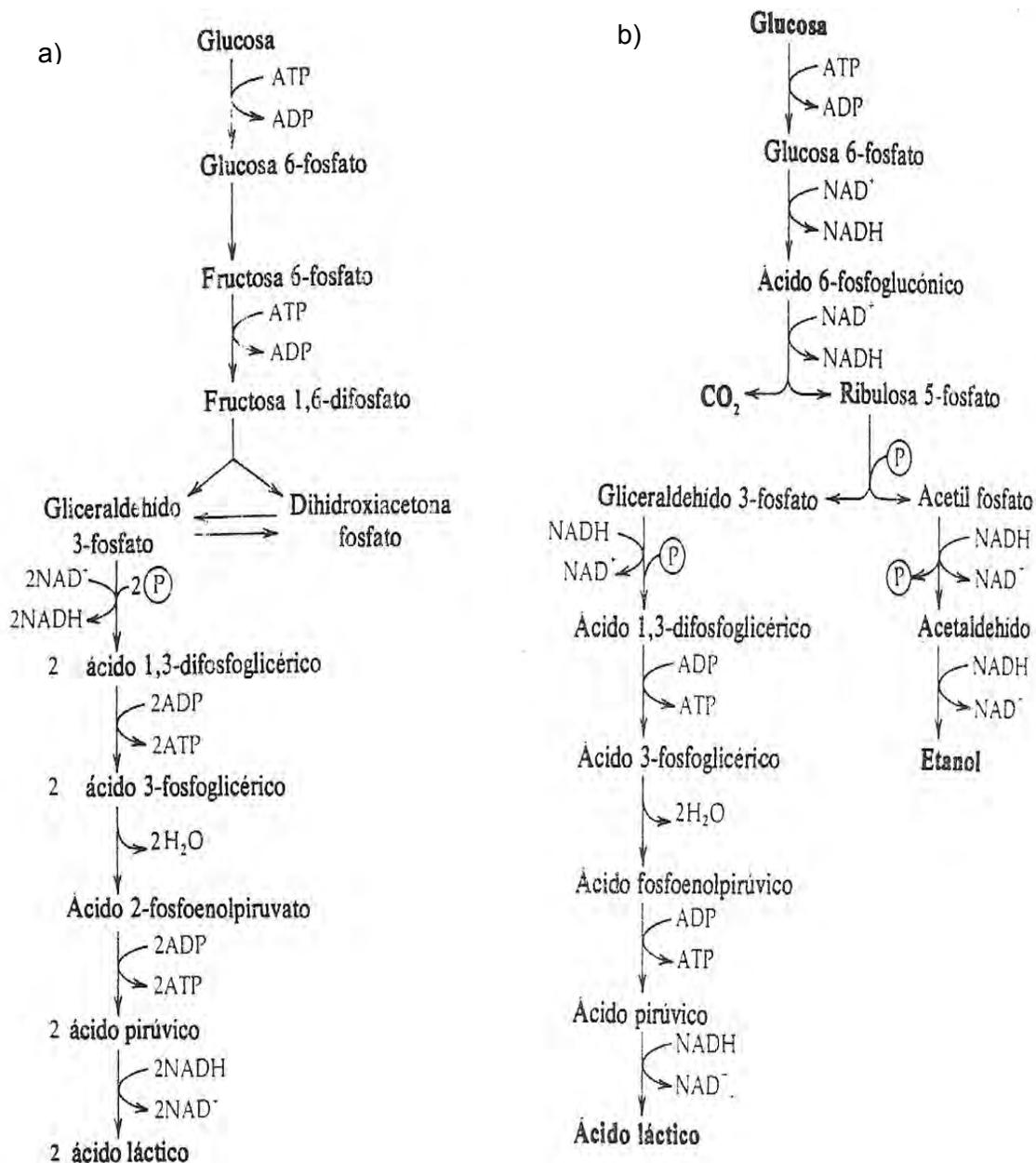
Las BAL homofermentadoras producen más del 85% de ácido láctico. Se fermenta 1 mol de glucosa a 2 moles de ácido láctico, lo que genera un rendimiento neto de 2 moles de ATP por molécula de glucosa metabolizada.

Mientras que las BAL heterofermentadoras generan solo el 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa a 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO<sub>2</sub>. Un mol de ATP se genera por un mol de glucosa, resultando en un menor rendimiento por mol de glucosa metabolizada (Gopal *et al.*, 2007).

Las bacterias lácticas también se han caracterizado por su capacidad de formar isómeros de ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa, el dextrógiro (D), el levógiro (L) y una mezcla racémica (DL) (Gopal *et al.*, 2007).

La capacidad de las bacterias lácticas para producir y tolerar una concentración relativamente elevada de ácido láctico tiene un gran valor selectivo, ya que les permite eliminar la competencia de la mayoría de las otras bacterias en ambientes que son ricos en nutrientes.

Dentro de las BAL homofermentadoras se incluyen especies de *Streptococcus* y *Pediococcus*. Las BAL heterofermentadoras están conformadas por especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Carr *et al.*, 2002).



**Figura 2.9.2.1 a) Fermentación homoláctica, vía Embden-Meyerhof.**  
**b) Fermentación heteroláctica, vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa.**  
(Stainer et al., 1992)



## **2.10. Identificación de microorganismos.**

Los alimentos fermentados contienen generalmente microbiotas complejas, que son difíciles de describir y de estudiar experimentalmente. Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos; otra es utilizar métodos que no dependan del cultivo, en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento (Díaz y Wacher, 2003). El estudio de las comunidades microbianas durante mucho tiempo estuvo basado en el uso de técnicas microbiológicas tradicionales, sin embargo, en años recientes se ha descrito que resultan insuficientes para dicho estudio ya que se ha determinado que más del 90% de los microorganismos de los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando estas metodologías (Amann y Kühn, 1998), sin embargo, siguen estando vigentes y se recomienda incluirlas en los métodos de identificación de microorganismos.

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Estos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares, entre otros. Para la caracterización de las bacterias ácido lácticas se emplean reacciones bioquímicas tradicionales, fermentación de carbohidratos y pruebas de inhibición (temperatura, pH y sal) (Salminen y Von Wright, 1993)



---

### **2.10.1. Pruebas bioquímicas.**

Las pruebas bioquímicas se basan en la actividad metabólica de los organismos. Sistemas de huella digital fenotípica miniaturizados y automatizados han sido introducidos reemplazando a los clásicos análisis fenotípicos, ya que dan resultados reproducibles obtenidos en condiciones estandarizadas, están basados en caracteres nutricionales y bioquímicos de los microorganismos. El procedimiento de estos sistemas incluye la comparación de un gran número de propiedades fenotípicas de un organismo con las mismas de otros considerados como referencia y el grado de similitud respecto a las cepas tipo es calculado con programas de cómputo. Los sistemas API (BioMérieux), Enterotube II y Oxi-Ferm Tube (Becton Dickinson Microbiological Systems), Sistema Pasco (Difco Laboratories), Sistema biolog (Biolog, Inc.) entre otros, son ejemplos de sistemas comercialmente validos de identificación miniaturizados. Estos sistemas son fáciles de llevar a cabo y los resultados son obtenidos en corto tiempo, son prácticos en la identificación de cepas bacterianas dentro de un contexto quimiotaxonómico y molecular (Busse *et al.*, 1996)

#### **2.10.1.1. Galería API 50CH para la identificación de bacterias lácticas.**

La galería API 50CH de BioMérieux es un sistema estandarizado que está compuesto por 49 pozos y un control, cada uno con una cantidad definida de sustrato deshidratado, que permite observar la fermentación de los sustratos que incluye la galería, los cuales pertenecen a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos) y se consideran como



ensayos bioquímicos. Se adiciona una suspensión bacteriana y se rehidratan los sustratos de ensayo de fermentación, cuando ésta se lleva a cabo, se produce un cambio de color en el pozo, debido al catabolismo de los suatratos, dando lugar a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH púrpura de bromocresol. El sistema API 50CH miniaturizado es un método rápido, sencillo y fiable que permite la identificación de microorganismos fermentadores de carbohidratros como las bacterias lácticas. Esta galería es la de mayor espectro de aplicación, pues identifica especies de los géneros más comunes de BAL tales como: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weissella* (Manual API 50CH de BioMérieux).



### **3.0. JUSTIFICACIÓN.**

México cuenta con una gran variedad de alimentos fermentados tradicionales, sin embargo, sólo algunos han sido objeto de investigaciones étnicas, antropológicas, sociales, microbiológicas y químicas. Estos alimentos tienen importancia alimentaria entre los grupos étnicos y en mayor o en menor grado por algunos grupos mestizos que regularmente los preparan y consumen. Los productos son elaborados mediante métodos de fermentación transmitidos de generación en generación hasta la actualidad, es entonces importante el estudio de estos productos porque forman parte de nuestra cultura así como para preservarlos o expandir el mercado de productos fermentados de bajo costo y desarrollar nuevos productos pues hoy en día se prefieren los productos naturales. Es importante conocer a detalle las materias primas, el proceso de elaboración y los microorganismos involucrados en el proceso fermentativo, así como investigar los beneficios a la salud que se les atribuyen. El atole agrio, es una bebida fermentada tradicional de México que no ha sido estudiada, no se han descrito las materias primas, las etapas de elaboración ni el procesos fermentativo. Su método de elaboración, que es diferente al de la mayoría de los alimentos fermentados de maíz que se han reportado, podría contener una microbiota diferente debido a la ausencia de la nixtamalización del maíz. Es importante entonces estudiar la diversidad de su microbiota, para comprender el efecto del procesamiento del maíz en el establecimiento de bacterias lácticas y por otra parte para desarrollar en un futuro un cultivo iniciador para su producción en condiciones controladas con calidad constante e inocuidad.



#### **4.0. HIPÓTESIS.**

La diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa, Tabasco será diferente a la de otros alimentos fermentados elaborados a partir de maíz debido a que su proceso de elaboración incluye maíz de dobla que no se nixtamaliza.

#### **5.0. OBJETIVOS.**

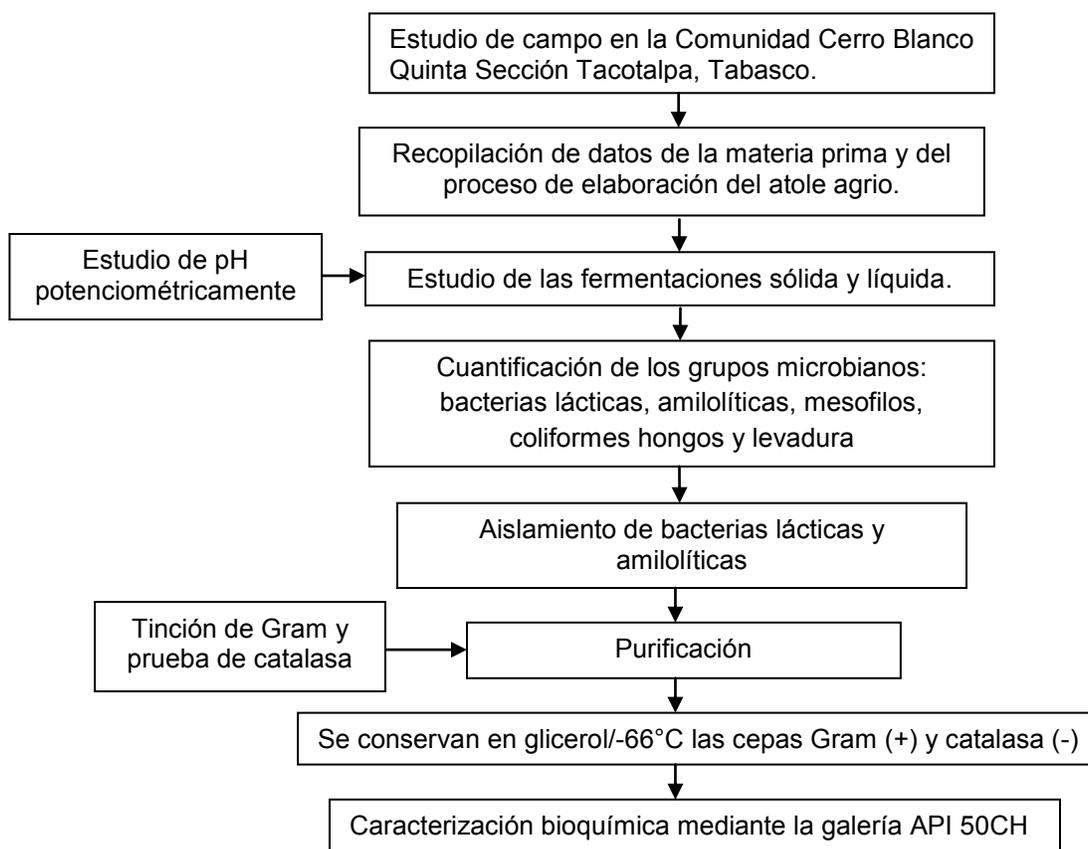
- Conocer la microbiota láctica del atole agrio de Villahermosa, Tabasco y describir el proceso de su elaboración.

Objetivos particulares:

- Describir con detalle las etapas de elaboración del atole.
- Detectar en cada una de las etapas anteriores las concentraciones de grupos microbianos que pudieran desarrollarse: bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes.
- Aislar e identificar bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.
- Comparar la microbiota encontrada con la reportada para otros productos elaborados a partir de maíz.



## 6.0. METODOLOGÍA.



**Figura 6.1. Diagrama de la metodología de trabajo para la caracterización bioquímica de las bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa Tabasco.**



---

### **6.1. Muestreo del atole agrio.**

El muestreo del atole agrio se realizó en Septiembre de 2010 en la comunidad Cerro Blanco Quinta Sección Tacotalpa, Tabasco. La comunidad se encuentra ubicada aproximadamente a dos horas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por ello fue necesario trasladar a la comunidad el equipo necesario (micropipetas, balanza analítica (OHAUS Adventurer) y material estéril como: guantes, puntas, bolsas y recipientes de plástico) para muestrear la materia prima así como los primeros tiempos fermentación sólida y líquida de la manera más asépticamente posible. Posteriormente el seguimiento de las fermentaciones y el procesamiento de las muestras se realizó en la universidad, en la tabla 6.1.1 se indica el lugar en donde se muestreo la materia prima así como los diferentes tiempos de las fermentaciones.

En la UJAT las muestras se procesaron inmediatamente y se trabajó en condiciones de asepsia en campanas de flujo laminar (Veco).

El muestreo de las fermentaciones se efectuó de la siguiente manera:

- ✓ Fermentación líquida se siguió al inicio y después de cada hora durante un período de 6 horas.
- ✓ Fermentación sólida se estudió al inicio y después de cada 2 horas durante 12 horas y a las 24 horas de fermentación.

Las mediciones de pH se realizaron al mismo tiempo que los muestreos de las fermentaciones.



**Tabla 6.1.1. Lugares donde se realizaron los muestreos de la materia primara y de los diferentes tiempos de las fermentaciones líquida y sólida.**

LUGAR DONDE SE MUESTREO	MUESTRAS
Comunidad de cerro blanco Quinta Sección Tacotalpa, Tabasco	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agua</li><li>• Maíz de dobla después de la molienda (masa)</li><li>• Tiempo 0, 1 y 2 h de la fermentación líquida.</li><li>• Tiempo 0 y 2 h de la fermentación sólida.</li></ul>
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tiempo 3, 4, 5 y 6 h de la fermentación líquida</li><li>• Tiempo 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h de la fermentación sólida.</li></ul>

## 6.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon dos días antes del muestreo en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Se sometieron a prueba de esterilidad, incubándose por 24 h a 28°C (Incubadora Carbolite). Los grupos microbianos que se estudiaron así como los medios de cultivos característicos para su crecimiento se muestran en la tabla 6.2.1.

Todos los medios se prepararon de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Anexo 10.4.). Así mismo, se preparó agua peptonada estéril al 0.1% en tubos de ensayo y matraces Erlenmeyer de 250 ml para realizar las diluciones. Una vez preparados los medios de cultivo se colocó una clave sobre la caja de Petri para su identificación las claves se muestran a continuación:

- -1, -2, -3, -4 a -6 (ml de atole/ ml) = Dilución
- S = Fermentación sólida
- L = Fermentación líquida
- 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 12 = Tiempo de fermentación (h)
- P = Producto final
- A = Agua
- M = Masa



**Tabla 6.2.1 Grupos microbianos cuantificados en el atole agrio de Villahermosa Tabasco**

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Descripción de la colonia típica
<b>Bacterias lácticas totales</b>	MRS (Man, Rogosa y Sharpe Agar MRS) (Difco)	Colonias pequeñas circulares. Casi nunca están pigmentadas; la colonia tiene un aspecto blanco color yeso, muy característico (Stainer, 1992).
<b>Bacterias lácticas amilolíticas</b>	Man, Rogosa y Sharpe Agar suplementado con almidón MRS-A (Componentes, anexo 10.4)	Colonias pequeñas circulares. Casi nunca están pigmentadas; la colonia tiene un aspecto blanco color yeso. Tienen un halo claro alrededor de la colonia (Stainer, 1992).
<b>Mesófilos aerobios</b>	Agar Cuenta Estándar (Difco)	Recuento total, se incluyen todas las colonias presentes en el medio de cultivo (Camacho <i>et al.</i> , 2007).
<b>Mohos y levaduras</b>	Agar Papa Dextrosa (Oxoid)	La forma de las colonias puede ser desde esférica a ovoide. Son húmedas y algo mucosas. La mayoría son blancuzcas aunque algunas tienen un color crema o rosado. Los mohos son aterciopelados o algodonosos, a veces pigmentados (Camacho <i>et al.</i> , 2007)
<b>Coliformes</b>	Agar Bilis Rojo Violeta (Difco)	Colonias de color rojo oscuro generalmente rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas, de color rojo claro o rosa (Camacho <i>et al.</i> , 2007).

### 6.3. Materia prima.

Se emplearon 60 mazorcas de tamaño mediano recién cosechadas de una parcela familiar, del periodo de dobla de septiembre. El agua para la elaboración del atole agrio se tomó directamente de la llave al momento de la preparación.

### 6.4. Instrumentos para la elaboración del atole agrio.

Para desgranar las mazorcas se utilizó un utensilio de metal llamado desgranador. Se empleó un molino eléctrico para realizar la molienda de los granos de maíz.



Para llevar a cabo la fermentación líquida se utilizaron botes de plástico de aproximadamente 4 litros de capacidad.

En la fermentación sólida se emplearon recipientes de plástico de tamaño mediano. Los atoles se cocieron en ollas de aluminio caseras con capacidad para 2 litros aproximadamente y para homogenizar palas de madera de tamaño mediano.

### **6.5. Preparación del atole agrio de Villahermosa Tabasco.**

La pizca se realizó el día 10 de Septiembre de 2010 y el atole se proceso el día 13 de Septiembre del mismo año.



***Figura 6.5.1. Mazorcas de maíz para la elaboración del atole agrio.***

Las mazorcas se deshojaron manualmente el mismo día de elaboración del atole (Figura 6.5.1.).

Posteriormente se desgranaron las mazorcas, para ello participaron cuatro mujeres, esta operación se realizó manualmente o con la ayuda del desgranador.



Los granos de maíz se recolectaron en recipientes de plástico y se procedió a retirar granos dañados (Figura 6.5.2.).



**Figura 6.5.2. Desgranado del maíz de dobla para la preparación del atole agrio.**

Al finalizar el desgranado se molieron los granos, esta operación se realizó con un molino eléctrico que limpian antes de la molienda (según declaración del productor) la masa solo se pasó una vez por el molino (Figura 6.5.3.).



**Figura 6.5.3. Molienda de los granos de maíz de dobla.**



Durante la molienda no se agregó agua, con la humedad de los granos fue suficiente. El resultado fue una masa blanca, ligeramente granulada. Inmediatamente después de la molienda la masa se dividió en dos partes iguales y se colocó en recipientes de plástico y se amasó con las manos, solo una mujer realizó esta operación y las consecutivas.

### **6.5.1. Fermentación sólida.**

En la fermentación sólida, se formaron bolas de masa manualmente. La forma y el peso de las bolas de masa es variable generalmente pesan alrededor de 100 g (Figura 6.5.1.1.).



***Figura 6.5.1.1. Formación de bolas de masa para la fermentación sólida.***

Las bolas de masa se colocaron en recipientes de plástico y se cubrieron con gasa y se fermentaron a temperatura ambiente (31- 32 °C) por un periodo de 12 horas.



Para el estudio de la fermentación sólida se llevaron a cabo 4 fermentaciones paralelas del atole agrio, las cuales se nombraron como Lote 1, Lote 2, Lote 3 y Lote 4. Cada lote contaba con 10 bolas de masa (Figura 6.5.1.2.).

El lote 1 y 2 se emplearon para el estudio microbiológico, el lote 3 para el seguimiento de pH y el lote 4 como testigo, éste último lote fue el que se sometió a cocción.



**Figura 6.5.1.2 Fermentación sólida. Se muestran las bolas de masa en recipientes cubiertos con gasa.**

Al término de la fermentación se agregó agua, la relación masa-agua fue de aproximadamente 1:1 (p/v).

### **6.5.2. Fermentación líquida.**

En la fermentación líquida la masa se suspendió en agua disgregándola con la mano hasta su completa incorporación, se utilizó un recipiente de plástico (Figura 6.5.2.1.). La relación masa-agua es aproximadamente 1:1 (p/v).



Para el estudio de la fermentación líquida se prepararon aproximadamente 6 L de líquido a fermentar, los cuales se dividieron en 4 lotes (A, B, C y D) cada uno contenía 1.5 L.



**Figura 6.5.2.1. Homogenización de la masa para la fermentación líquida.**

Los lotes A y B se emplearon para el estudio microbiológico, el lote C para el seguimiento de pH y el lote D como testigo. Cada recipiente se cubrió con gasa y se fermentó a temperatura ambiente (31-32°C) por 6 horas. (Figura 6.5.2.2.).



**Figura 6.5.2.2. Fermentación líquida. Se muestran los recipientes que se usaron para realizar la fermentación, con el sustrato.**



### 6.5.3. Cocción del atole agrio.

Después del tiempo de fermentación los atoles se pasaron por un colador de plástico para retirar la cascarilla del maíz y no fue necesario agregar más agua. Posteriormente se hirvieron los atoles (94-96°C) hasta que se obtuvo una consistencia más espesa aproximadamente 10 minutos para el atole de la fermentación sólida y 6 minutos para el atole de la fermentación líquida, en la comunidad utilizan el término *atolar* (Figura 6.5.3.1.). El tiempo de cocción depende de que tan espeso se desee el atole agrio. Para la cocción se utilizaron ollas de peltre y palas de madera limpias.



**Figura 6.5.3.1. Producto terminado de la fermentación sólida.**

### 6.6. Muestras: agua, maíz después de la molienda, líquido y masa de fermentación.

Se tomaron muestras del agua, del maíz después de la molienda, de la masa y del líquido de fermentación así como del producto después de la cocción.

Para el muestreo del agua, se tomó una muestra de 100 ml directamente de la llave en un recipiente de vidrio estéril.



En el caso de la masa después de la molienda se tomaron dos muestras de 25 g (Balanza analítica OHAUS Adventurer) y se colocaron en bolsas de plástico (Ziploc) inmediatamente ambas muestras se colocaron en hielo.

De las muestras a fermentar se tomaron 25 g (Balanza analítica OHAUS Adventurer) y 25 ml según fuera la muestra sólida o líquida respectivamente, se colocaron en bolsas de plástico (Ziploc) y de igual forma se colocaron en hielo. Las muestras fueron procesadas en la Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco.

## **6.7. Cuantificación de grupos microbianos en las materias primas y en el atole agrio.**

### **6.7.1. Inoculación de las muestras en los medios de cultivo MRS, MRS-A ACP, PDA y BRVA.**

En el caso de la fermentación sólida se pesaron 25 g de masa, tomando porciones del interior y exterior de la bola de masa (Balanza analítica OHAUS Adventurer) y se colocaron en una bolsa de plástico (Ziploc) posteriormente se adicionaron 225 ml de agua peptonada al 0.1% estéril. En la fermentación líquida se tomó una muestra de 25 ml y se colocó de igual forma en una bolsa de plástico (Ziploc). Ambas muestras se homogenizaron de forma manual por un minuto (Figura 6.7.1.1).

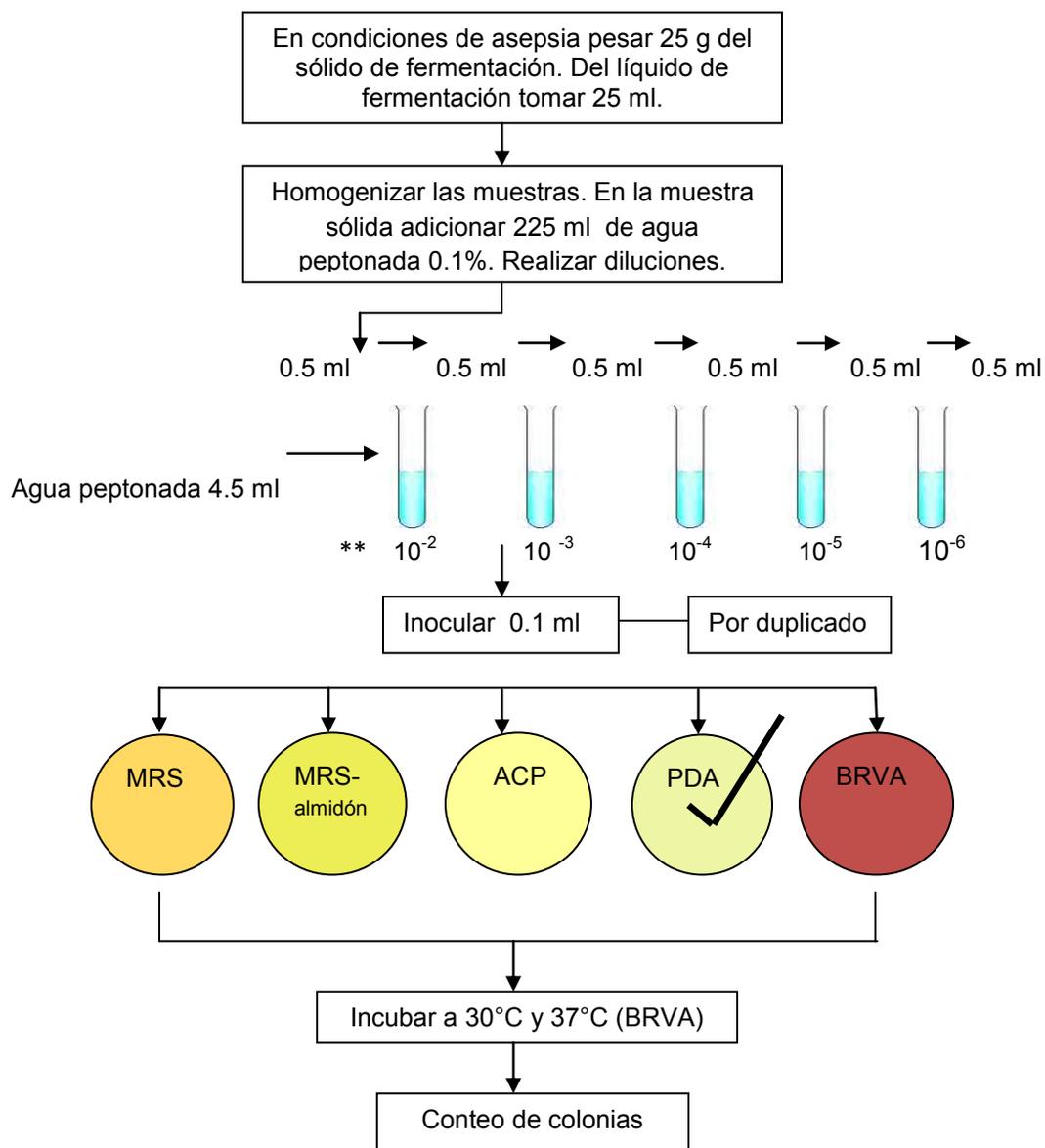
Posteriormente se realizaron diluciones decimales como se muestra en la figura 6.7.1.2 el volumen inoculado (0.1 ml) se extendió en el medio de cultivo con una varilla en forma de triángulo de acero inoxidable (previamente a la extensión del inóculo la varilla se sumergió en etanol y después se colocó sobre la flama del



mechero de Bunsen) para distribuir de manera homogénea se realizaron movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo. Se esperó alrededor de 10 minutos para que el inóculo se absorbiera en el agar, posteriormente las placas se invirtieron y se incubaron a 30 °C (Incubadora Carbolite) por 24 horas.



***Figura 6.7.1.1. Homogenización de las muestras de masa para su análisis microbiológico.***



**Figura 6.7.1.2. Diagrama que muestra el proceso de cuantificación de grupos microbianos en las muestras de atole agrio (fermentación sólida y líquida).**

\*\* Las diluciones a sembrar para el estudio microbiológico de atole agrio se muestran en los anexos 10.2.



### **6.7.2. Cuenta en placa de los diferentes grupos microbianos.**

Se consideraron representativas las cajas que tuvieran un número de colonias dentro del rango de 25 a 250 unidades formadoras de colonias (UFC) para bacterias lácticas, amilolíticas y mesofilos, en el caso de los hongos y levaduras el rango de sensibilidad fue de 10 a 150 UFC y para los coliformes fue de 15 a 150 UFC por placa (NOM- 092, 111 y 113 respectivamente). Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes se aplicó el factor de dilución, que es el inverso de la dilución, se multiplicó por 10, para tener la cuenta por ml o g y se redondeó el número a 2 cifras significativas y potencias de 10. Se escogieron las placas representativas de cada medio para aislar a los microorganismos. Las cajas Petri seleccionadas se trasladaron en refrigeración al laboratorio 324 del departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química UNAM.

### **6.8. Medición de pH durante la fermentación.**

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro (HANNA Meter). Previo a las mediciones el potenciómetro se calibró con un amortiguador de pH 7 (solución de fosfatos de sodio y potasio) y un amortiguador de pH 4 (solución de ftalato ácido de potasio). Para la medición de pH de la fermentación sólida se pesaron 2 g de masa y se adicionaron 5ml de agua destilada. En el caso de la fermentación líquida se tomó una muestra de 5 ml.



---

### **6.9. Aislamiento de bacterias lácticas totales y bacterias lácticas amilolíticas.**

De las cajas de los medios MRS y MRS-A que tuvieron un número de colonias entre 25 y 250 UFC se escogieron 3 colonias que presentaban características morfológicas macroscópicas típicas de estos grupos microbianos (colonias pequeñas de color blanco). Estas se sembraron por agotamiento (cuadrante radial), resemebrándose hasta 2 veces en el mismo medio del que provenían (MRS y MRS-A) y se incubaron de 18-24 h a 28°C (Incubadora, VWR Scientific Inc.). Posteriormente a las colonias aisladas se les realizó la prueba de catalasa y tinción de Gram. Las colonias se describieron visualmente tomando en cuenta las siguientes características de la colonia: forma, borde, elevación, color y textura. En el caso de las bacterias amilolíticas otra característica evaluada visualmente fue la formación de halos claros alrededor de la colonia debido a la actividad amilolítica. La formación de halos claros en el medio MRS-Almidón se hace evidente cuando las cajas Petri después del tiempo de incubación (18-24 h) son colocadas en refrigeración ya que el almidón del medio se retrograda provocando que el medio se opaque y con ello sea evidente la formación de estos halos debido a la difusión de las amilasas extracelulares al medio de cultivo.

### **6.10. Purificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.**

Para la certificación de la pureza de los microorganismos se revisó la morfología de las colonias y la microscópica. Se consideraron puros los aislados que mostraran características constantes. Para confirmar que fueran bacterias lácticas se realizó tinción de Gram, esperando obtener bacilos o cocos Gram positivos y la prueba de catalasa, que debe ser negativa (Ver anexos 10.1) (Mac Faddin, 2003).



---

### **6.11. Conservación de las cepas de las bacterias lácticas.**

Confirmada la pureza de las cepas mediante las observaciones microscópicas y morfológicas de la colonia así como por la prueba de catalasa, se llevó a cabo la conservación de las cepas, para ello se hicieron crecer las cepas en caldo MRS (Difco) de 18-24 h a 28 °C (Incubadora VWR Scientific Inc.), una vez que se observó un crecimiento en los viales, (turbidez en el medio) se transfirieron 1,2 ml del cultivo a microtubos de plástico (los cuales contenían 0.3 ml de glicerol y habían sido esterilizados previamente) en condiciones de asepsia (Campana de flujo, Veco) posteriormente se agitaron los microtubos en el vortex hasta la completa homogenización del glicerol con el cultivo, finalmente se almacenaron en el ultracongelador a -66 °C (Ultracogelador Puffer Hubbard). Cada microtubo se marco con una clave para su identificación (Ver anexos 10.3.).

### **6.12. Caracterización bioquímica de las bacterias lácticas mediante la galería API 50CH.**

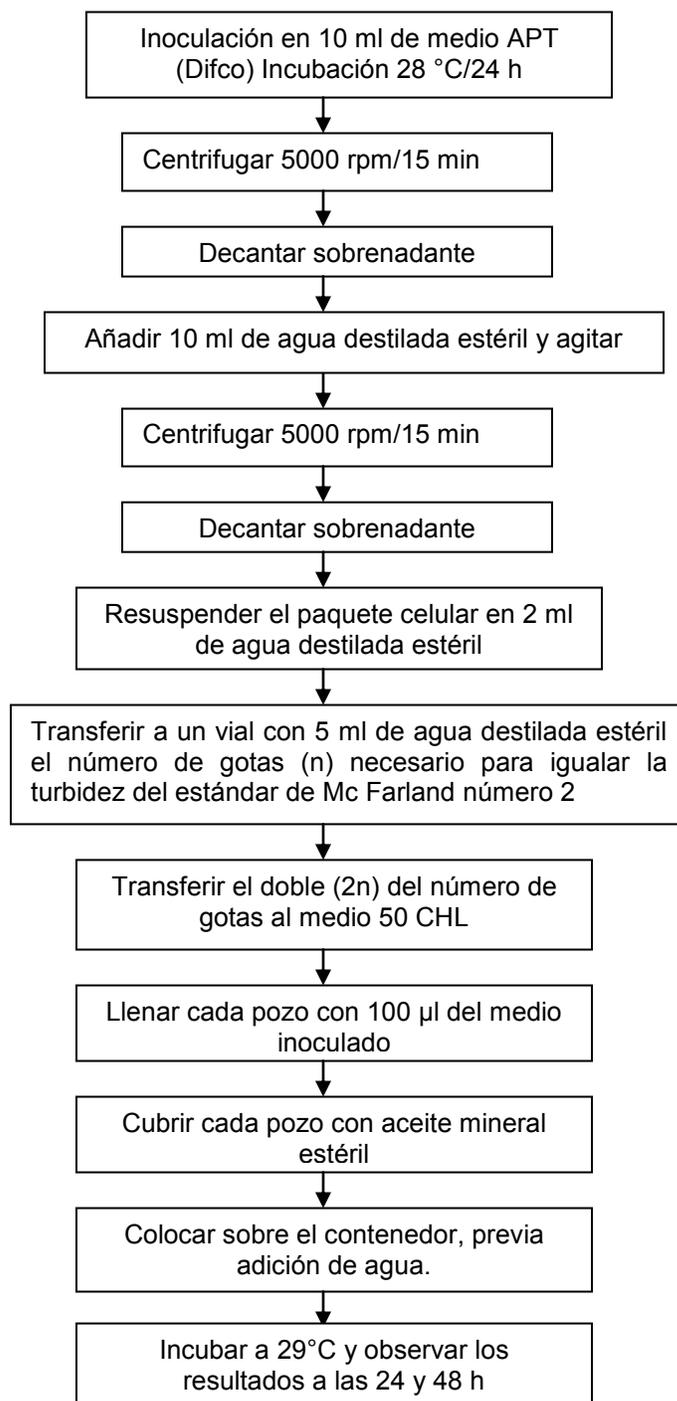
Para la caracterización bioquímica se empleó el sistema API 50CH de BioMérieux, en el cual se adiciona una suspensión bacteriana a un total de 49 pozos con un carbohidrato diferente en cada uno y un control (Tabla 6.12.1). Se modificó el método con respecto a las especificaciones del proveedor sustituyendo la obtención de microorganismos puros a partir de cajas con medio sólido por microorganismos obtenidos a partir del desarrollo en medio líquido (caldo MRS), con la finalidad de garantizar una cantidad suficiente de microorganismos para la fermentación de los azúcares (Villegas, 1995).



El método se muestra en la figura 6.12.1. La capacidad de fermentar dichos azúcares se determinó por el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol, indicador que vira a amarillo si el microorganismo fermenta el carbohidrato. Se analizaron los datos obtenidos de la fermentación de los carbohidratos en el programa APIWEB (BioMérieux). El programa proporciona: porcentaje de identificación del taxón, calidad de identificación (excelente, muy buena, buena, baja, aceptable, dudosa y no válida), perfil de carbohidratos, prueba T de student, pruebas en contra y pruebas complementarias.

**Tabla 6.12.1. Composición de la galería API 50CH de BioMérieux.**

GALERIA API 50CH									
Banda 0-9		Banda 10-19		Banda de 20-29		Banda de 30-39		Banda 40-49	
Pozo	Sustrato	Pozo	Sustrato	Pozo	Sustrato	Pozo	Sustrato	Pozo	Sustrato
0	Control	10	Galactosa	20	Metil-D-Manósido	30	Melibiosa	40	Turanosa
1	Glicerol	11	Glucosa	21	Metil-D-Glucósido	31	Sacarosa	41	Lixosa
2	Eritritol	12	Fructosa	22	N-Acetil-Glucosamina	32	Trehalosa	42	Tagatosa
3	D-arabinosa	13	Manosa	23	Amigdalina	33	Inulina	43	D-Fucosa
4	L-arabinosa	14	Sorbosa	24	Arbutina	34	Melezitosa	44	L-Fucosa
5	Ribosa	15	Ramnosa	25	Esculina	35	Rafinosa	45	D-Arabitol
6	D-xilosa	16	Dulcitol	26	Salicina	36	Almidón	46	L-Arabitol
7	L-xilosa	17	Inositol	27	Celobiosa	37	Glicogeno	47	Gluconato
8	Adonitol	18	Manitol	28	Maltosa	38	Xilitol	48	2-Ceto-Gluconato
9	Metil-D-Xilosido	19	Sorbitol	29	Lactosa	39	Gentiobiosa	49	5-Ceto-Gluconato



**Figura 6.12.1. Fermentación de carbohidratos mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.**



---

## **7.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **7.1. Recopilación de datos de materias primas y proceso de elaboración del atole agrio.**

#### **7.1.1. Atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

En el estado de Tabasco diversos grupos indígenas y mestizos consumen una bebida regional ácida, no alcohólica preparada con una masa elaborada con maíz de dobla, no nixtamalizado y fermentado, que se conoce como atole agrio. Para la descripción del proceso de elaboración del producto se recurrió a la Sra. Susana Cruz de 54 años de edad, habitante de la comunidad Cerro Blanco Quinta Sección Tacotalpa, Tabasco, quien elabora y consume el atole de manera habitual.

#### **7.1.2. Materia base: Maíz de dobla.**

La materia base para elaborar este atole agrio es el maíz, llamado localmente como maíz de dobla, debido a que tallo de la planta es doblado por la mitad, de esta manera, al quedar unido a la planta está protegido por ella, mientras pierde humedad. El doblado del tallo se realiza alrededor de treinta días antes de ser cosechado. El maíz es blanco, criollo. Los señores de la comunidad seleccionan de su cosecha las mejores mazorcas y las guardan para la siembra del siguiente ciclo.

Generalmente, cuando el maíz se encuentra en la etapa de madurez fisiológica se cosecha y se deja secar, para obtener el maíz maduro. El maíz recién cosechado contiene aproximadamente 30% de humedad, por lo que los microorganismos presentes podrían desarrollarse fácilmente. Para evitar esto, el maíz se dobla



dentro de la misma planta y se deja que pierda humedad (Figura 7.1.2.1.). La mazorca está protegida del ataque microbiano, ya que sigue siendo parte de la planta, que cuenta con sistemas antimicrobianos.



**Figura 7.1.2.1. Maíz de dobla**

## **7.2. Elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

El atole agrio se elabora únicamente en el periodo de dobla, en los meses de mayo y septiembre, meses en los cuales los habitantes de Cerro Blanco cosechan el maíz de sus parcelas. El proceso de elaboración consiste en cosechar el maíz, deshojar las mazorcas, desgranarlas, moler los granos, formar las bolas de masa en el caso de la fermentación sólida o mezcla de agua y masa si se realiza la fermentación líquida. En la figura 7.2.1 se muestra el diagrama general del proceso de elaboración. En la preparación del atole participan varias mujeres y la mayoría de las operaciones se realizan manualmente por lo cual durante su procesamiento pueden incorporarse microorganismos. En Cerro Blanco Tacotalpa generalmente la fermentación sólida es la más empleada de



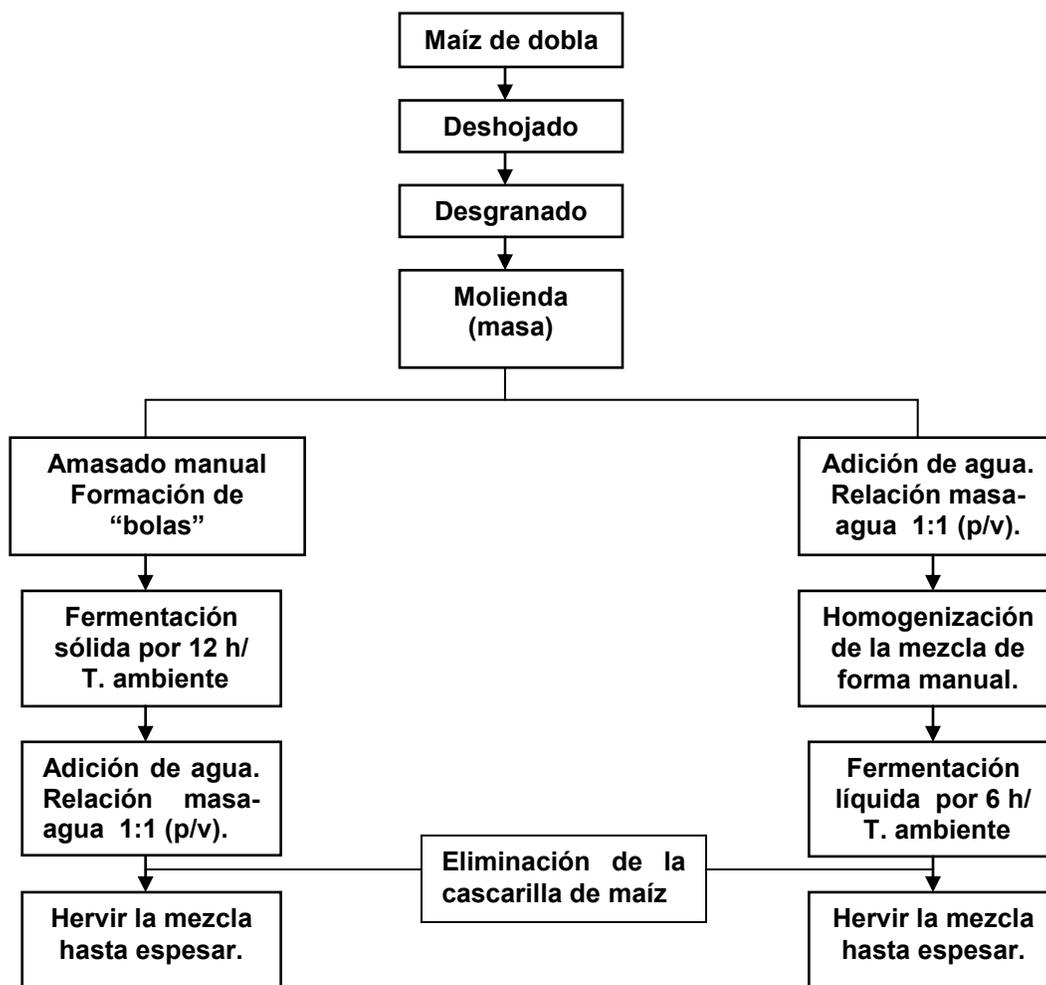
acuerdo con la persona entrevistada. La limpieza del molino eléctrico se realizó de manera muy superficial solo se pasó un trapo mojado para retirar polvo o residuos de las moliendas anteriores. El agua empleada para la preparación del atole se tomó directamente de la llave no se hirvió previamente. De acuerdo con la señora Susana Cruz, la comunidad de Cerro Blanco se abastece de agua de un manantial cercano y sólo algunas personas tienen acceso a esta zona para evitar contaminación. El agua está entubada para su traslado a la comunidad y no es tratada.

Al término de ambas fermentaciones se observaron las mismas características en los atoles, un color blanco, sabor ácido y textura granulada, sin embargo, la consistencia del atole de la fermentación sólida fue menos espesa, esto posiblemente se debió a que el agua fue añadida al final de la fermentación en comparación con la fermentación líquida. Antes de cocer los atoles, estos se pasaron por un colador de plástico para retirar la cascarilla del maíz, con lo cual se disminuyó considerablemente la textura granulada. Ambos atoles después de la cocción presentaron una consistencia espesa, con una textura ligeramente granulada y un sabor ácido. Este atole se puede adicionar de azúcar.

Tradicionalmente, es consumido por mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree que este aumenta la cantidad de leche que se produce, así mismo los habitantes de la comunidad le atribuyen una mejora a la salud cuando se padece de diarrea. También es preparado para la celebración del día de Muertos para colocarlo en las ofrendas dedicadas a los difuntos que disfrutaban de esta bebida.



En los meses de septiembre y mayo constituye parte importante en la dieta de los habitantes de esta comunidad.



*Figura 7.2.1. Diagrama de la elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.*



### 7.3. Análisis microbiológico.

#### 7.3.1. Cuantificación de grupos microbianos del agua de la Comunidad de Cerro Blanco.

El agua que se utiliza en la comunidad de Cerro Blanco para uso y consumo proviene de un manantial, los resultados del análisis microbiológico se muestran en la tabla 7.3.1. Se obtuvieron cuentas considerablemente altas de cada uno de los grupos microbianos evaluados, sin embargo, no se detectó la presencia de mohos. La cuenta para coliformes es elevada lo que indicó que es de mala calidad higiénica.

**Tabla 7.3.1.1. Concentración de microorganismos del agua de manantial que abastece a la Comunidad de Cerro Blanco (UFC/ml).**

Bacterias lácticas*	Bacterias lácticas amilolíticas*	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes
$37 \times 10^1$	$35 \times 10^1$	$73 \times 10^2$	$56 \times 10^1$	$< 10^1$	$61 \times 10^2$

\*Estos valores deberán confirmarse, ya que las cuentas fueron bajas y algunas colonias que se examinaron dieron positiva la prueba de la catalasa.

Para saber si el agua era adecuada para la elaboración del atole agrio se comparó la concentración de coliformes obtenida con lo que marca la *NOM-127-SSA1-1994* y de acuerdo con está el agua de la comunidad de Cerro Blanco excede el límite permisible de organismos coliformes totales que es 2UFC/100ml. Esto indicó que el agua aporta microorganismos no deseables a la masa de maíz durante la elaboración del atole agrio.



### 7.3.2. Cuantificación de grupos microbianos del maíz de dobla después de la molienda (masa).

Después de la molienda se obtuvieron concentraciones considerablemente altas de todos los grupos microbianos evaluados (Tabla 7.3.2.1.), esto podría deberse a la limpieza tan superficial del molino, favoreciendo la acumulación de residuos en el mismo y puede constituir un foco de contaminación.

La concentración de mesófilos, coliformes y bacterias lácticas amilolíticas fue mayor a la esperada, no fueron suficientes las diluciones que se propusieron.

**Tabla 7.3.2.1. Concentración de microorganismos del maíz recién molido (UFC/g).**

Bacterias lácticas	Bacterias lácticas amilolíticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes
$26 \times 10^4$	$> 10^5$	$> 10^5$	$84 \times 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$

### 7.3.3. Cuantificación de grupos microbianos en la fermentación líquida del atole agrio.

En las Tablas 7.3.3.1 y 7.3.3.2 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los lotes de las diferentes etapas de la fermentación líquida. Al comparar los resultados se observa que en ambos lotes de fermentación las concentraciones iniciales de los microorganismos son altas para los grupos microbianos, los mohos no se detectaron en ningún lote de la fermentación líquida. No hay una diferencia importante entre lotes de fermentación, el crecimiento fue masivo y ninguno de los grupos microbianos fue inhibido por la disminución de pH, en ambos lotes se comienza con un valor de pH alrededor de 6.44 después de 6 horas de fermentación se alcanzó un pH de 4.05 en los 2 lotes (Figura 7.4.1.). En el caso de las bacterias lácticas en ambos lotes al tiempo cero se comienza



con una cuenta similar del orden de  $10^4$  UFC/ml, a las 3 horas de fermentación los dos lotes alcanzaron una concentración microbiana de  $10^6$  UFC/ml, a partir de las 4 horas de fermentación el crecimiento se intensificó. El resto de los grupos microbianos (Bacterias lácticas amilolíticas, mesófilos, coliformes y levaduras) tuvieron un crecimiento superior al esperado desde el inicio de la fermentación y este comportamiento se observó hasta las seis horas de fermentación. Las diluciones propuestas no fueron suficientes para tener un conteo en placa confiable.

**Tabla 7.3.3.1 Concentración de microorganismos en la fermentación líquida (UFC/ml), lote 1.**

Tiempo (Horas)	Bacterias lácticas	Bacterias lácticas amilolíticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes	pH
0	$91 \times 10^4$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.38
1	$14 \times 10^4$	$82 \times 10^3$	$> 10^5$	$83 \times 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.52
2	$14 \times 10^5$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.41
3	$20 \times 10^6$	$> 10^5$	$20 \times 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	5.42
4	$43 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^5$	$58 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.33
5	$42 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^5$	$40 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.15
6	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.05



**Tabla 7.3.3.2 Concentración de microorganismos en la fermentación líquida (UFC/ml), lote 2.**

Tiempo (Horas)	Bacterias lácticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes	pH
0	$80 \times 10^4$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.5
1	$11 \times 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.49
2	$58 \times 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.4
3	$16 \times 10^6$	$25 \times 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	5.42
4	$40 \times 10^6$ valor estimado	$25 \times 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.43
5	$50 \times 10^6$ valor estimado	$42 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.14
6	$40 \times 10^6$ valor estimado	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.05

Se colocó la leyenda “valor estimado” a las placas que excedían las 250 colonias. Se contaron las colonias en las porciones de la placa que eran representativas, en algunas se contó una cuarta parte o una mitad del área de la caja de Petri y se multiplico el valor obtenido por 4 ó 2 respectivamente.

#### **7.3.4. Cuantificación de grupos microbianos en la fermentación sólida del atole agrio.**

En las tablas 7.3.4.1 y 7.3.2 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los lotes de las diferentes etapas de la fermentación sólida. La concentración de bacterias lácticas al inicio de la fermentación fue del orden de  $10^4$  UFC/g a las 4 horas el crecimiento aumentó notablemente en ambos lotes, sin embargo, la concentración de bacterias lácticas amilolíticas, mesófilos, coliformes y levaduras fue alta desde el inicio de la fermentación este comportamiento se mantuvo durante las 24 horas fermentación excepto para los coliformes pues se observó



una disminución en la concentración en ambos lotes de la fermentación sólida cuando el valor de pH fue de 4.15 y 4.27 lote 1 y lote 2 respectivamente. Los mohos no fueron detectados en ninguno de los lotes.

**Tabla 7.3.4.1. Concentración de microorganismos en la fermentación sólida (UFC/g), lote 1.**

Tiempo (Horas)	Bacterias lácticas	Bacterias lácticas amilolíticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes	pH
0	$26 \times 10^4$	$> 10^5$	$> 10^5$	$84 \times 10^4$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.38
2	$13 \times 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^4$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.17
4	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	5.50
6	$> 10^6$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.92
8	$16 \times 10^6$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.75
10	$> 10^6$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.58
12	$> 10^6$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.47
24	$> 10^6$	$> 10^5$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$45 \times 10^2$	4.15

**Tabla 7.3.4.2. Concentración de microorganismos en la fermentación sólida (UFC/g), lote 2.**

Tiempo (Horas)	Bacterias lácticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes	pH
0	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.38
2	$84 \times 10^4$	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	6.44
4	$76 \times 10^5$ valor estimado	$> 10^5$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	5.66
6	$17 \times 10^6$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.89
8	$> 10^6$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.66
10	$> 10^6$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.52
12	$> 10^6$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$> 10^4$	4.45
24	$> 10^6$	$> 10^6$	$> 10^5$	$< 10^2$	$41 \times 10^2$	4.27



---

Al comparar la fermentación sólida y líquida (Tablas 7.3.3.1, 7.3.3.2 7.3.4.1 y 7.3.2) se observa que el crecimiento de las bacterias lácticas se incrementó de forma importante a partir de las 4 horas de fermentación. En general los grupos microbianos crecieron de forma masiva y su crecimiento no se ve afectado por la disminución de pH ni por la posible presencia de metabolitos. Las diluciones realizadas no fueron suficientes para obtener colonias aisladas que pudieran contarse de manera confiable.

Comparando las cuentas microbianas obtenidas en el atole agrio con el *pozol* se ha reportado (Wacher *et al.*, 2000) que en el *pozol* indígena la concentración microbiana inicial (UFC/g<sup>-1</sup>) fue: BAL, 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup>; mesófilos aerobios, 10<sup>4</sup> - 10<sup>6</sup>; enterobacterias, 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> y levaduras 10<sup>4</sup>. En el producto fermentado a 28°C a las 48 h la concentración de BAL fue de 10<sup>9</sup> UFC/g.

En otros estudios se ha reportado que en muestras de *pozol* se han detectado cuentas grandes (10<sup>5</sup> UFC/g) de bacterias lácticas amilolíticas al inicio de la fermentación, cuando el pH era de 7.4. Estas se incrementaron a 10<sup>9</sup> UFC/g a las 24 horas y se mantuvieron sin cambio apreciable hasta las 72 horas, cuando se alcanzó un pH de 3.9 - 4.2. La cuenta de bacterias lácticas amilolíticas constituyó aproximadamente el 10% del total de las bacterias lácticas a las 24 horas de fermentación (Díaz *et al.*, 2003).

Comparando las concentraciones microbianas obtenidas del atole agrio con lo reportado para el *pozol*, se puede decir que la microbiota del atole agrio al inicio de la fermentación es mayor en todos los grupos microbianos, esto puede



---

atribuirse a que en la elaboración del atole agrio no se lleva a cabo el proceso de nixtamalización, durante el cual se eliminan microorganismos. En el caso del *pozol* la cuenta microbiana reportada al cabo de 48 y 24 horas de fermentación para las bacterias lácticas y amilolíticas respectivamente ha sido de  $10^9$  UFC/g, una cuenta considerablemente alta.

El *Ogi* es otro alimento tradicional fermentado similar al atole agrio. Es un desayuno popular y alimento complementario para niños en varios países de África a base de maíz. Para elaborarlo, los granos de maíz se remojan en agua tibia por 1 a 3 días, se muelen y cuelan para remover la fibra, el hollejo y la mayoría del germen, el filtrado se fermenta, finalmente se diluye en agua y se cuece (Nout *et al.*, 2007). Se ha reportado que la concentración de bacterias lácticas presentes a las 48 horas de fermentación es de  $10^8 - 10^9$  UFC/ml (Oguntoyinbo y Narbad, 2012). En el atole agrio analizado a las 6 horas de fermentación sólida las cuentas de BAL fueron superiores a  $10^6$  UFC/g (Tablas 7.3.4.1 y 7.3.4.2) lo cual indica la similitud en el crecimiento de bacterias lácticas en alimentos elaborados de forma similar.

El atole agrio *Acoxotl* de Cuetzalan, Puebla es una bebida agria, no alcohólica de color verdoso, preparada con maíz hecho masa y nixtamalizado, fermentado de 3-4 días. Estudios realizados por Guadarrama (2007) con técnicas tradicionales de microbiológica indicaron que en el *Acoxotl* las concentraciones microbianas después de 48 horas de fermentación ( $\text{Log}_{10}/\text{ml}$ ) fue: BAL 3.78, BALA 4.03 y mesófilos 3.7.



---

Las concentraciones microbianas en el atole agrio de BAL, BALA y mesófilos que se obtuvieron en la fermentación líquida son mayores (Tablas 7.3.3.1 y 7.3.3.2) a las reportadas en el *Acoxotl* este comportamiento podría deberse a la ausencia de la nixtamalización en la elaboración del atole agrio.

En este primer estudio microbiológico del atole agrio de Villahermosa, Tabasco no fueron suficientes las diluciones para el conteo de los grupos microbianos, sin embargo, sirvió de base para futuros muestreos tal es el caso del realizado por Esquivel (2012) en el cual se detectaron después de 6 horas de fermentación líquida las siguientes concentraciones (UFC/ml):  $10^8$  BAL,  $10^{10}$  BALA,  $10^8$  levaduras,  $10^8$  mesófilos,  $10^6$  coliformes y  $10^6$  enterobacterias. En la fermentación sólida (después de 12 horas) las concentraciones microbianas (UFC/g) fueron las siguientes:  $10^8$  BAL,  $10^8$  BALA,  $10^{11}$  levaduras,  $10^8$  mesófilos,  $< 10^6$  para coliformes y enterobacterias.

La presencia de bacterias lácticas es importante en los alimentos fermentados tradicionales a base de maíz, las concentraciones al término del proceso fermentativo en alimentos similares al atole agrio oscilan en el orden de  $10^8 - 10^9$  UFC/ml o g.

### **7.3.5. Cuantificación de grupos microbianos en el atole agrio después de la cocción.**

Terminadas las fermentaciones (6 y 12 h fermentación líquida y sólida respectivamente) se cocieron las masas para obtener los atoles agrios. Se enfrió el producto y se cuantificaron los grupos microbianos (Tabla 7.3.5.1.). En el atole agrio que provenía de la fermentación líquida estuvieron presentes todos los



grupos microbianos evaluados. Se obtuvo una concentración del orden de  $10^3$  UFC/ml. En el caso del atole agrio de la fermentación sólida ninguno de los grupos microbianos se detectó, la concentración microbiana en general fue  $<10^2$  UFC/g.

Este comportamiento posiblemente se deba al tiempo de cocción, el atole agrio de la fermentación líquida se sometió a cocción durante seis minutos mientras que el atole agrio de la fermentación sólida requirió de 10 minutos de cocción para alcanzar la consistencia espesa característica de este atole.

**Tabla 7.3.5.1. Concentración de microorganismos en el atole agrio de las fermentaciones líquida y sólida después de la cocción (UFC/ml y UFC/g respectivamente).**

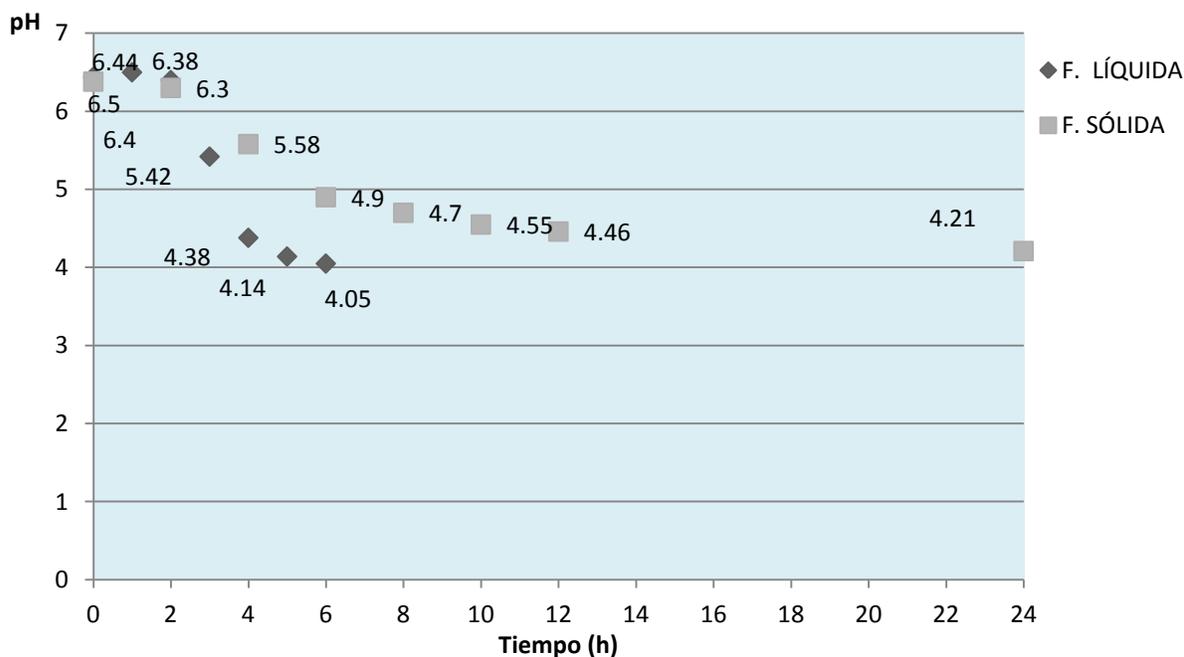
Atole agrio	Bacterias lácticas	Bacterias lácticas Amilolíticas	Mesófilos	Levaduras	Mohos	Coliformes	pH
F. LÍQUIDA Lote 1	$22 \times 10^3$ valor estimado	$5 \times 10^3$	$17 \times 10^3$	$13 \times 10^3$ valor estimado	$< 10^2$	$3 \times 10^2$	4.42
F. LÍQUIDA Lote 2	$25 \times 10^3$	-----	$22 \times 10^3$	$17 \times 10^3$	$< 10^2$	$2 \times 10^3$ valor estimado	
F. SÓLIDA Lote 1 y 2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^1$	4.70

#### 7.4. Seguimiento de pH- potenciométrico.

En la figura 7.4.1 se presentan los promedios de las mediciones de pH de los lotes de fermentación líquida y sólida del atole agrio. El pH de inicio es similar en ambos tipos de fermentación 6.44 y 6.38 líquida y sólida respectivamente. El pH en la fermentación líquida disminuyó con mayor rapidez y en un menor tiempo pues al cabo de 6 horas el pH bajó hasta 4.05, en cambio para la fermentación sólida que duró 12 horas el pH final fue de 4.46. En la fermentación sólida el único grupo microbiano que se afectó con la disminución de pH fueron los coliformes totales, ya que al cabo de 24 horas de fermentación cuando el pH era de 4.21 la cuenta



microbiana de este grupo disminuyó de  $> 10^4$  a  $10^2$  UFC/g, sin embargo, en la fermentación líquida en la cual el pH bajó hasta 4.05 no se redujo la concentración de coliformes, desde el inicio hasta el término de la fermentación la concentración fue  $>10^4$  UFC/ml. Se esperaba que los coliformes desaparecieran en la fermentación líquida más fácilmente que en la sólida, ya que en la última los ácidos deben difundirse desde el punto en el cual se producen, de tal forma que pueden existir microambientes de pH mayor; sin embargo no ocurrió así. Aun con la acidificación de la masa los coliformes en ambas fermentaciones sobrevivieron. Se ha reportado que los alimentos fermentados ácidos se consideran más seguros que los no fermentados, ya que el crecimiento de bacterias patógenas comúnmente se suprime o se reduce significativamente (Simago y Rukure, 1992).



**Figura 7.4.1. Valores de pH de las diferentes etapas de las fermentaciones sólida y líquida.**

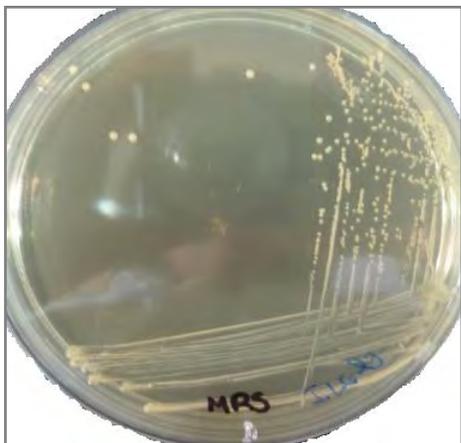


Se ha reportado para el *pozol* indígena donde se lleva a cabo una fermentación sólida, que las enterobacterias están presentes inclusive a un pH de 4.5 a las 48 horas de fermentación (Wacher *et al.*, 2000) y que esto se debe a que algunas enterobacterias son resistentes a la acidez (Sainz *et al.*, 2001). En otros alimentos fermentados similares al atole agrio como el *ogí* y el *mahewu* al cabo de 24 horas se alcanza a un pH de 4.3 y 3.5 respectivamente (Blandino *et al.*, 2003).

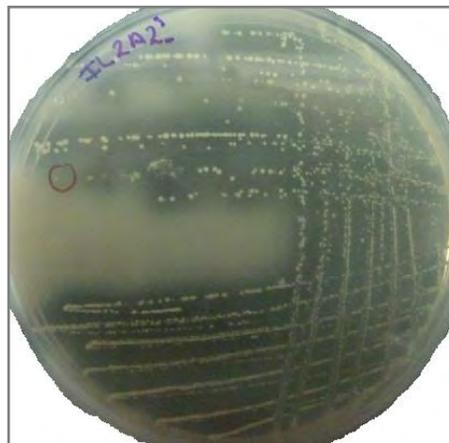
### **7.5. Aislamiento de bacterias lácticas y amilolíticas.**

Para cada tiempo de fermentación líquida y sólida se picaron 3 colonias presuntivas de bacterias lácticas en el caso de las bacterias amilolíticas no se picaron colonias de todos los tiempos de fermentación debido al gran crecimiento microbiano. A las 3 colonias elegidas de cada tiempo de fermentación se les realizó la prueba de catalasa y tinción de Gram para corroborar que se trataba de bacterias lácticas. En las figuras 7.5.1 y 7.5.2 se muestran las características generales de la morfología de las colonias (forma circular, borde entero, elevación convexa, color blanco y textura viscosa. Para bacterias lácticas amilolíticas se observó otra característica que fue la formación de un halo claro alrededor de la colonia a las 72 horas debido a la actividad amilolítica.

Después de las observaciones microscópicas y macroscópicas se obtuvieron un total de 72 aislados de bacterias lácticas y 8 aislados de bacterias amilolíticas Gram (+) y catalasa (-) (Ver anexos 10.1).

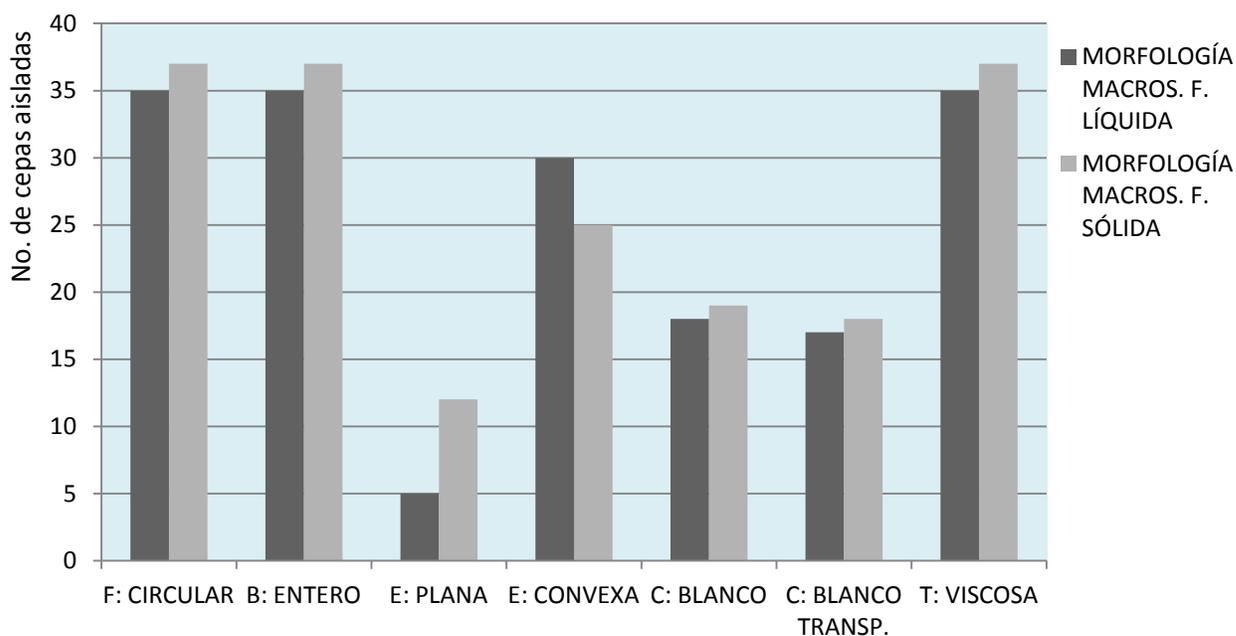


**Figura 7.5.1. Colonias de bacterias lácticas aisladas de la F. líquida**



**Figura 7.5.2. Colonias de bacterias amilolíticas, aisladas de la F. líquida**

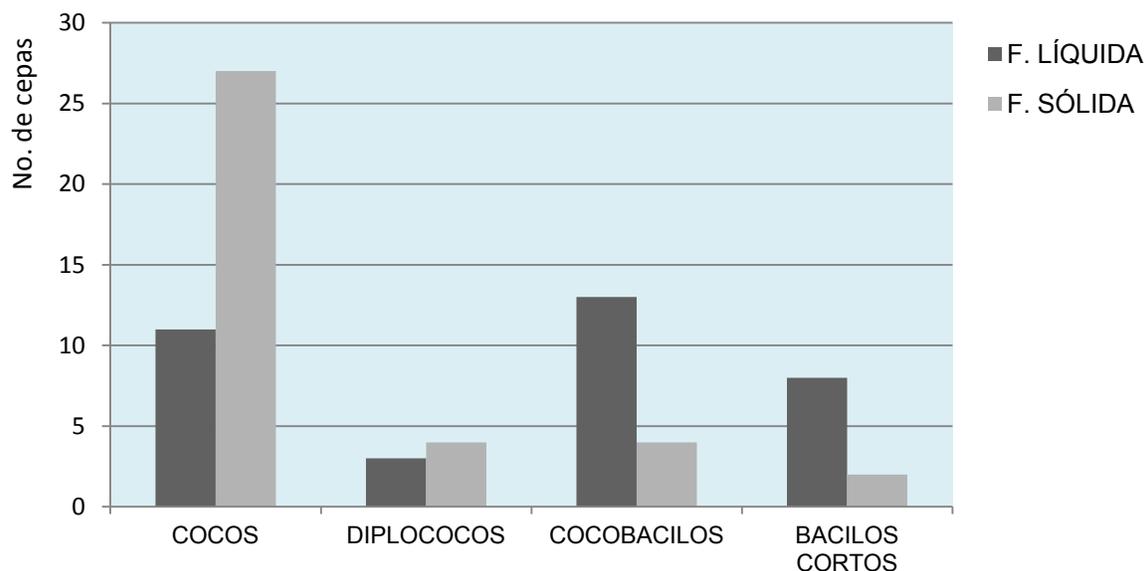
En la figura 7.5.3 se muestran las características coloniales de las bacterias lácticas aisladas de las fermentaciones líquida y sólida del atole agrio. En todas las colonias se encontró una forma circular al igual que un borde entero y una textura viscosa, sin embargo se observaron diferencias en la elevación y el color. Tanto en las fermentaciones líquida como sólida predominó la forma convexa en las colonias de las cepas de BAL. En cuanto al color, las colonias de las cepas de BAL de las fermentaciones líquida y sólida en su mayoría presentaron un color blanco.



**Figura 7.5.3. Frecuencia de las características morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

En la figura 7.5.4 se muestran en conjunto las frecuencias de las morfologías microscópicas en la fermentación líquida como en la fermentación sólida.

En la fermentación líquida predominó la forma de cocobacilos, continuando en cantidad por los cocos y bacilos cortos y en menor proporción los diplococos. En la fermentación sólida dominaron los cocos, se encontró una menor cantidad de cocobacilos y bacilos cortos con respecto a la fermentación líquida y en menor proporción se encontró a los diplococos al igual que en la fermentación líquida.



**Figura 7.5.4 Frecuencia de la morfología microscópica de las bacterias lácticas aisladas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

Los aislados de bacterias amilolíticas presentaron una morfología macroscópica similar en ambas fermentaciones se observó una forma circular, borde entero y una textura viscosa. Se encontraron diferencias en el color y la elevación, el color que predominó fue el color blanco transparente. El tiempo requerido para que se evidenciara la actividad amilolítica (halos claros alrededor de las colonias) osciló entre las 72 y 82 horas en refrigeración. La morfología microscópica con mayor frecuencia observada en ambas fermentaciones fue la cocoide (Ver anexos 10.3).

## **7.6. Conservación de las cepas de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.**

Se conservaron un total de 72 cepas de bacterias lácticas de las cuales 35 cepas corresponden a la fermentación líquida y 37 cepas corresponden a la fermentación sólida.



Se conservaron 8 cepas de bacterias lácticas amilolíticas, 4 cepas se obtuvieron de la fermentación líquida y las 4 cepas restantes de la fermentación sólida. Todas las cepas se conservaron en microtubos de plástico, se les colocó una clave para su identificación y se almacenaron en ultracongelación a  $-66^{\circ}\text{C}$  (Ver anexos 10.3).

### **7.7. Identificación de las cepas lácticas y amilolíticas.**

Se seleccionaron cepas de las diferentes etapas de fermentación del atole agrio y con diferente morfología microscópica. De la fermentación líquida se identificaron 3 cepas (1, 10 y 31) y de la fermentación sólida se identificaron 4 cepas (4, 22, 26 y 33).

Los resultados de la fermentación de carbohidratos de las cepas seleccionadas del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux se muestran en la tabla 7.7.1 así mismo en la tabla 7.7.2 se presentan los perfiles de fermentación de carbohidratos por las cepas de bacterias lácticas amilolíticas de la fermentación líquida (1, 2, 3 y 4) y fermentación sólida (5, 6, 7 y 8).



**Tabla 7.7.1. Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de bacterias lácticas de la fermentación líquida y sólida provenientes del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux a las 48 horas de incubación.**

CARBOHIDRATOS																									
CEPAS	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
22	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
26	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
33	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+

	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
1	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Tabla 7.7.2. Perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas de la fermentación líquida y sólida provenientes del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux a las 48 horas de incubación.**

CARBOHIDRATOS																										
CEPAS	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
3	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
7	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
8	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	
1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
4	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Todas las cepas de bacterias lácticas identificadas mediante el sistema API 50CH fermentaron monosacáridos sencillos como la glucosa, fructosa y manosa. También fermentaron disacáridos como la celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, gentiobiosa y solo las cepas 4 y 22 de BAL fermentaron la lactosa. Todas las cepas coincidieron en la fermentación de la N-acetilglucosamina, la esculina y la maltosa. Otros carbohidratos en los que fue evidente la fermentación fueron la ribosa, D-xilosa, arbutina y salicina. Las cepas 31, 22, 26 y 33 de BAL obtuvieron resultados en los perfiles de fermentación muy similares.

Todas las cepas de bacterias lácticas amilolíticas fermentaron carbohidratos sencillos tales como la glucosa, fructosa y manosa. Otros monosacáridos que se fermentaron fueron L-arabinosa, ribosa, D-xilosa y la galactosa.

Las cepas 1 y 4 de BALA fueron las que menos carbohidratos fermentaron. El resto coincidieron en la fermentación de disacáridos como celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealosa y gentobiosa. La cepa 3 de BALA fue la única que fermentó al almidón y al gluconato. Los datos de los perfiles de fermentación que se obtuvieron se analizaron en el programa de APIWEB de BioMérieux, los resultados de la identificación de las cepas se presentan en las tablas 7.7.3, 7.7.4, 7.7.5 y 7.7.6. Las cepas fermentaron monosacáridos presentes en el maíz como la glucosa y fructosa y disacáridos como la sacarosa y maltosa.



**Tabla 7.7.3. Identificación de bacterias lácticas que provenían de la fermentación líquida del atole agrio mediante sistema API 50CH de BioMérieux.**

No. de cepa	Clave	Identificación	%ID	Comentario
1	IL112	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	70.9	Identificación aceptable en género
10	IL512	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	93.6	Buena identificación
31	IIL612	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.4	Muy buena identificación

**Tabla 7.7.4. Identificación de bacterias lácticas que provenían de la fermentación sólida del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.**

No. de cepa	Clave	Identificación	%ID	Comentario
4	IS213	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98.5	Buena identificación
22	IIS412	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	96.8	Buena identificación
26	IIS613	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	74.1	Baja discriminación
33	IIS1211	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	98.2	Buena identificación

**Tabla 7.7.5. Identificación de bacterias lácticas amilolíticas que provenían de la fermentación líquida del atole agrio mediante el sistema API 50CH de BioMérieux.**

No. de cepa	Clave	Identificación	%ID	Comentario
1	IL2A2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	53.6	Buena identificación en el género.
2	IL4A2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	96.8	Buena identificación.
3	IL6A1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.9	Excelente identificación.
4	IL6A2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	72.9	Muy buena identificación en el género.

**Tabla 7.7.6. Identificación de bacterias lácticas amilolíticas que provenían de la fermentación sólida del atole agrio mediante sistema API 50CH de BioMérieux.**

No. de cepa	Clave	Identificación	%ID	Comentario
5	IS6A1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	98.9	Buena identificación.
6	IS6A3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	96.4	Muy buena identificación en el género.
7	IS10A2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	95.7	Buena identificación.
8	IS12A1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	91.3	Baja discriminación.



---

En ambas fermentaciones (líquida y sólida) se identificaron los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* siendo este último el que se identificó con mayor frecuencia, en la fermentación sólida se identificó también a *Lactobacillus plantarum*.

Los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* también han sido reportados en las fermentaciones que utilizan maíz como sustrato, tal es el caso del *pozol*, *poto-poto* y *ogi* de México, Congo y Benin respectivamente mediante estudios de DGGE. La presencia de estas bacterias sugiere que se trata de especies de importancia en la fermentación de maíz (Ampe *et al.*, 1999, Ampe y Miambi, 2000).

El microorganismo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se identificó durante el desarrollo de la fermentación sólida y líquida desde el inicio hasta el término de éstas, de igual forma todas las cepas identificadas como amilolíticas corresponden a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* por lo anterior se asume que su presencia debe ser relevante para el proceso fermentativo, sin embargo, su hábitat más importante está en leche cruda, leche fermentada y quesos. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ya sea en forma pura o asociada con otros microorganismos, es la cepa más comúnmente usada como un cultivo iniciador de productos lácteos (Jensen y Hammer, 1993; Salminen, y Von Wright, 1993). Las cepas de *Lactococcus lactis* asociada con productos vegetales se le ha prestado menos atención (Martínez-Cuesta *et al.* 1997, Van y Hahn Hagerdal, 1999).

En el pozol se han aislado bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. y *Pediococcus* sp. (Wacher *et al.*, 2000).



---

---

En el estudio de Ben Omar y Ampe (2000) se encontró la presencia de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* entre otros sin embargo, la presencia de *Lactococcus lactis ssp. lactis* no se ha reportado en este alimento fermentado tradicional. Las principales especies de bacterias lácticas amilolíticas que se han encontrado en el pozol corresponden a los géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Díaz *et al.*, 2003).

En otros alimentos fermentados elaborados a base de maíz como el *kenkey* (masa cocida, de sabor ácido) de Ghana, se han aislado bacterias lácticas como: *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus reuteri* (Blandino, 2003).

El *mahewu* es una bebida tradicional ácida no alcohólica a base de maíz producida en Sudáfrica. El microorganismo predominante durante la fermentación espontánea es *Streptococcus lactis* (Blandino *et al.*, 2003).

En el oeste de África y Nigeria se produce un alimento de complemento para niños elaborado a partir de maíz fermentado llamado *ogi*. En este alimento se han identificado diversos Lactobacilos como: *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* (Blandino *et al.*, 2003).

Aunque diversos productos tienen como sustrato base al maíz la microbiota que se ha reportado es diferente a la que se encontró en el atole agrio, por lo cual el proceso de elaboración influye en el establecimiento de las bacterias lácticas.

En México en la comunidad de Cuetzalan, Puebla se consume un atole agrio llamado *Axocolt*. Estudios microbiológicos han demostrado que este atole tiene una microbiota compleja, compuesta por bacterias lácticas y levaduras. En el estudio de Guadarrama (2007), para conocer la diversidad de bacterias lácticas en *Axocolt* se realizó el análisis de la restricción del DNA ribosomal amplificado



---

---

(ARDRA) los microorganismos tipificados fueron *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus plantarum* (este último microorganismo también se encontró en el presente estudio). Se consideró como fuente de inóculo al maíz, maíz nixtamalizado y a las hierbas.

La bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* aislada e identificada en el atole agrio se presenta de manera frecuente en bebidas que tienen como sustrato al maíz ya sea nixtamalizado o no. La presencia de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* no ha sido reportada como parte de la microbiota láctica amilolítica en productos fermentados similares al atole agrio.



---

---

## 8.0. CONCLUSIONES.

El atole agrio es una bebida fermentada tradicional mexicana que se elabora a partir de maíz de dobla no nixtamalizado. Las etapas de elaboración del atole incluyen deshojado de las mazorcas de maíz, desgranado, molienda, amasado, fermentación sólida o líquida, eliminación de la cascarilla y cocción. El atole agrio presentó una microbiota compleja ya que posee una alta concentración de los grupos microbianos: bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, mesofilos aerobios, coliformes totales y levaduras. Los anteriores grupos microbianos también se han identificado en alimentos tradicionales elaborados a partir de maíz; sin embargo la concentración microbiana en el atole agrio es mayor al inicio de la fermentación, posiblemente se deba a la ausencia del proceso de nixtamalización. El atole agrio es una bebida ácida ya que alcanzó un pH al final de las fermentaciones de entre 4.05 y 4.46, lo cual indica que ocurrió una fermentación láctica. De acuerdo con los resultados de la galería API 50CH las bacterias lácticas identificados fueron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* los dos primeros microorganismos se han reportado en la fermentación del *pozol* y en otros alimentos similares como el *ogi* y *mahewu*. En el atole agrio no se detectaron bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weissella* los cuales predominan durante la fermentación del *pozol*. Es posible entonces que la nixtamalización influya en el tipo de bacterias lácticas que se desarrollan en los alimentos.



---

---

## 9.0. PERSPECTIVAS.

- \* Realizar otros muestreos del atole agrio, proponiendo diluciones más altas para el conteo de los grupos microbianos.
- \* Realizar muestreos microbiológicos de las manos de las personas que elaboran el atole agrio así como del molino y de los utensilios utilizados para su elaboración para conocer la influencia de la concentración microbiana en el atole.
- \* Complementar la identificación de las bacterias lácticas totales y bacterias lácticas amilolíticas con el uso de métodos moleculares.
- \* Realizar muestreos del atole agrio en el período de dobla de mayo para comparar la microbiota encontrada con el atole agrio del periodo de dobla de septiembre.
- \* Realizar un estudio microbiológico de los residuos de la cascarilla de maíz que son eliminados durante el proceso de elaboración del atole agrio para conocer la microbiota presente en ellos.
- \* Identificar los puntos críticos en la elaboración del producto y proponer mejoras con el fin de obtener un producto de mayor calidad.



---

---

## 10.0. ANEXOS.

### 10.1. Tinción de Gram y prueba de Catalasa.

#### 10.1.1. Fundamento de la tinción de Gram.

La pared celular de *Bacteria* está compuesta por una capa de peptidoglucano (o mureína) y está formada por fina láminas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina. Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido de glicano.

En bacterias Gram positivas el peptidoglucano representa hasta el 90% de la pared. En las bacterias Gram negativas, el peptidoglucano constituye alrededor del 10% de pared, estando constituido el resto por una membrana externa compuesta por lipopolisacárido.

Las diferencias estructurales entre las paredes de las bacterias Gram positivas y Gram negativas son las responsables del diferente comportamiento de las células a la tinción de Gram. En dicha tinción se forma dentro de las células un complejo cristal insoluble violeta-yodo que en el caso de las Gram negativas puede extraerse con alcohol, pero no en las Gram positivas. El alcohol deshidrata las bacterias Gram positivas, que poseen paredes celulares muy gruesa (90 con varias capas de peptidoglucano. Esto provoca el cierre de los poros de las paredes impidiendo la salida del complejo cristal violeta-yodo. En las bacterias Gram negativas, el alcohol penetra rápidamente en la capa externa que es rica en lípidos y la capa fina de peptidoglucano no impide el paso del solvente, por lo que el complejo se extrae fácilmente (Mandigan *et al.*, 2004). Para establecer el



---

---

verdadero carácter de Gram se recomienda trabajar con cultivos jóvenes (18-24 h).

### **10.1.2. Técnica de la tinción de Gram.**

A partir de cultivos con 18-24 h de crecimiento se realizó la tinción de Gram. El procedimiento efectuado es el siguiente: extensión de las células (frotis) sobre un portaobjetos en condiciones de asepsia, fijación por calor, se tiñe de modo sucesivo con un colorante básico, el cristal violeta y se deja actuar durante un minuto, moviendo suavemente el portaobjetos para favorecer el contacto del colorante con las células. Al cabo de un minuto se escurre el exceso de colorante y se lava con agua destilada, a continuación se cubre la preparación con lugol y se deja actuar durante un minuto, se escurre el exceso del reactivo y se lava con agua destilada, posteriormente se decolora agregando una mezcla de alcohol-acetona a la preparación, mientras se sostiene ligeramente inclinada para que el decolorante resbale. Tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastren color se procede a lavar con agua destilada, finalmente la preparación se cubre con safranina y se deja actuar por un minuto, de igual forma se retira el exceso de colorante, se lava con agua destilada y se deja secar al aire. La preparación se observa al microscopio con el objetivo 100X y se describen los resultados.

Las bacterias Gram-positivas resisten la decoloración y permanecen teñidas de color azul oscuro; las bacterias Gram-negativas son rápidamente decoloradas y se tiñen de rojo por la safranina (Pelczar *et al.*, 1982).



---

---

### **10.1.3. Fundamento de la prueba de catalasa.**

Se investiga la presencia en el microorganismo de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno, que se desprende en forma de burbujas en el medio.

### **10.1.4 Técnica de la prueba de catalasa.**

Se tiene una prueba positiva cuando se observa de inmediato burbujeo, observado con facilidad; formación de  $O_2$ . Las bacterias lácticas presentan una prueba de catalasa negativa es decir ausencia de burbujeo. El procedimiento efectuado es el siguiente: en condiciones asépticas con un asa bacteriológica se toma una porción del centro de una colonia pura de un cultivo de 18 a 24 h y se coloca sobre un portaobjetos de vidrio limpio, posteriormente se adiciona una gota de  $H_2O_2$  al 3% sobre los microorganismos y se observa si hay presencia o no de burbujeo y finalmente el portaobjetos se descarga en un desinfectante (Mac Faddin, 2003).



## 10.2. Diluciones para el estudio microbiológico del atole agrio.

**Tabla 10.2.1. Diluciones para el estudio microbiológico de las materias primas, líquido y sólido de fermentación y producto terminado.**

\* BLT = bacterias lácticas totales, BLAm = bacterias lácticas amilolíticas, MAT = mesófilos aerobios, ML = mohos y levaduras, CF = Coliformes.

\*\* MRS, MRS-A (almidón), ACE= Agar Cuenta Estándar en placa, PDA= Agar Papa Dextrosa y BRVA= Agar Bilis Rojo Violeta. Para las diluciones se empleo agua peptonanda al 0.1%.

MUESTRA	TIEMPO MUESTREO (h)	DILUCIONES A SEMBRAR	MO'S*	MEDIO**
<b>Agua inicial</b>	0	-1,-2,-3	BLT	MRS
		-1,-2,-3	BLAm	MRS-A
		-1,-2,-3	MAT	ACE
		-1,-2,-3	ML	PDA
		-1,-2,-3	CF	BRVA
<b>Después de la molienda</b>	0	-2,-3,-4	BLT	MRS
		-2,-3,-4	BLAm	MRS-A
		-2,-3,-4	MAT	ACE
		-2,-3,-4	ML	PDA
		-1,-2,-3	EB	BRVGA
		-1,-2,-3	CF	BRVA
<b>Durante la fermentación (líquida)</b>	0	-2,-3,-4	BLT	MRS
		-2,-3,-4	BLAm	MRS-A
		-2,-3,-4	MAT	ACE
		-2,-3,-4	ML	PDA
		-1,-2,-3	CF	BRVA
	1	-3,-4,-5	BLT	MRS
		-2,-3,-4	BLAm	MRS-A
		-3,-4,-5	MAT	ACE
		-2,-3,-4	ML	PDA
	2	-1,-2,-3	CF	BRVA
		-3,-4,-5	BLT	MRS
		-2,-3,-4	BLAm	MRS-A
		-3,-4,-5	MAT	ACE
	3	-2,-3,-4	ML	PDA
-1,-2,-3		CF	BRVA	
-3,-4,-5		BLT	MRS	
-2,-3,-4		BLAm	MRS-A	
4	-3,-4,-5	MAT	ACE	
	-2,-3,-4	ML	PDA	
	-1,-2,-3	CF	BRVA	
	-3,-4,-5	BLT	MRS	
5	-2,-3,-4	BLAm	MRS-A	
	-3,-4,-5	MAT	ACE	
	-2,-3,-4	ML	PDA	
	-1,-2,-3	CF	BRVA	
6	-3,-4,-5	BLT	MRS	
	-2,-3,-4	BLAm	MRS-A	
	-3,-4,-5	MAT	ACE	
	-2,-3,-4	ML	PDA	
		-1,-2,-3	CF	BRVA



**Continuación de la tabla 10.2.1. Diluciones para el estudio microbiológico de las materias primas, líquido y sólido de fermentación y producto terminado.**

\* BLT = bacterias lácticas totales, BLAm = bacterias lácticas amilolíticas, MAT = mesófilos aerobios, ML = mohos y levaduras, CF = Coliformes.

\*\* MRS, MRS-A (almidón), ACE= Agar Cuenta Estándar en placa, PDA= Agar Papa Dextrosa y BRVA= Agar Bilis Rojo Violeta (Anexos). Para las diluciones se empleo agua peptonanda al 0.1%.

Muestra	Tiempo de muestreo (h)	Diluciones a sembrar	MO'S*	MEDIO**
<b>Durante la Fermentación (Sólida)</b>	0	-2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	2	-2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	4	-2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	6	-3,-4,-5 -2,-3,-4 -3,-4,-5 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	10	-3,-4,-5 -2,-3,-4 -3,-4,-5 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	12	-3,-4,-5 -2,-3,-4 -3,-4,-5 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	24	-3,-4,-5 -2,-3,-4 -3,-4,-5 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF	MRS MRS-A ACE PDA BRVA
	<b>Producto final después de calentado</b>	0	-2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -2,-3,-4 -1,-2,-3	BLT BLAm MAT ML CF



### 10.3. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas y amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida y sólida del atole agrio.

Las claves usadas para identificar cada cepa son las siguientes:

I= Lote 1

II= Lote 2

L= Fermentación líquida.

S= Fermentación sólida.

F= Producto final después de la cocción.

0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 o 24 = Tiempo de fermentación.

ℓ= Bacteria láctica.

A= Bacteria láctica amilolítica.

1, 2 o 3= Número de colonia aislada del medio MRS.

**Tabla 10.3.1. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida lote 1 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

Fermentación líquida (Lote 1)									
No. de cepa	Clave	MORFOLOGÍA MACROSCOPICA					MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA
		Forma	Borde	Elevación	Color	Textura	Gram	Morfología	
1	IL1ℓ2	C	E	P	B	V	+	Diplococos	-
2	IL2ℓ1	C	E	P	B	V	+	Cocobacilos	-
3	IL2ℓ2	C	E	P	B-t	V	+	Cocos	-
4	IL3ℓ1	C	E	X	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
5	IL3ℓ3	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
6	IL4ℓ1	C	E	P	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
7	IL4ℓ2	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
8	IL4ℓ3	C	E	X	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
9	IL5ℓ1	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
10	IL5ℓ2	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
11	IL5ℓ3	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
12	IL6ℓ2	C	E	X	B	V	+	Bacilos cortos	-
13	IL6ℓ3	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
14	ILFℓ1	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
15	ILFℓ2	C	E	P	B	V	+	Cocos	-
16	ILFℓ3	C	E	X	B-t	V	+	Diplococos	-

C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa



**Tabla 10.3.2. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida lote 2 del atole agrio de Villahermosa Tabasco.**

Fermentación líquida (Lote 2)									
No. de cepa	Clave	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA					MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA
		Forma	Borde	Elevación	Color	Textura	Gram	Morfología	
17	III.012	C	E	X	B	V	+	Bacilos cortos	-
18	III.113	C	E	X	B	V	+	Diplococos	-
19	III.212	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
20	III.213	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
21	III.311	C	E	X	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
22	III.312	C	E	X	B	V	+	Bacilos cortos	-
23	III.313	C	E	X	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
24	III.411	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
25	III.412	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
26	III.413	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
27	III.511	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
28	III.512	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
29	III.513	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
30	III.611	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
31	III.612	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
32	III.613	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
33	III.F11	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
34	III.F12	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
35	III.F13	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-

C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa



**Tabla 10.3.3. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida lote 1 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

FERMENTACIÓN SÓLIDA (Lote 1)									
No. de cepa	Clave	Forma	MORFOLOGÍA MACROSCOPICA				MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA
			Borde	Elevación	Color	Textura	Gram	Morfología	
1	IS011	C	E	X	B-t	V	+	Cocobacilos	-
2	IS012	C	E	P	B-t	V	+	Cocos	-
3	IS212	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
4	IS213	C	E	P	B-t	V	+	Bacilos cortos	-
5	IS411	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
6	IS412	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
7	IS611	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
8	IS612	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
9	IS613	C	E	P	B-t	V	+	Cocos	-
10	IS811	C	E	X	B	V	+	Bacilos cortos	-
11	IS1011	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
12	IS1012	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
13	IS1013	C	E	X	B-t	V	+	Diplococos	-
14	IS1211	C	E	P	B	V	+	Cocos	-
15	IS1212	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
16	IS1213	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-

*C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa*



**Tabla 10.3.4. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida lote 2 del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

FERMENTACIÓN SÓLIDA (Lote 2)									
No. de cepa	Clave	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA					MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA
		Forma	Borde	Elevación	Color	Textura	Gram	Morfología	
17	IIS0t2	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
18	IIS2t1	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
19	IIS2t2	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
20	IIS2t3	C	E	P	B	V	+	Cocos	-
21	IIS4t1	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
22	IIS4t2	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
23	IIS4t3	C	E	P	B-t	V	+	Diplococos	-
24	IIS6t1	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
25	IIS6t2	C	E	P	B	V	+	Cocos	-
26	IIS6t3	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
27	IIS8t1	C	E	P	B-t	V	+	Diplococos	-
28	IIS8t2	C	E	P	B	V	+	Cocos	-
29	IIS8t3	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
30	IIS10t1	C	E	X	B	V	+	Cocobacilos	-
31	IIS10t2	C	E	P	B	V	+	Cocobacilos	-
32	IIS10t3	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
33	IIS12t1	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
34	IIS12t2	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-
35	IIS12t3	C	E	X	B	V	+	Cocos	-
36	IIS24t1	C	E	P	B-t	V	+	Diplococos	-
37	IIS24t3	C	E	X	B-t	V	+	Cocos	-

C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa



**Tabla 10.3.5. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación líquida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

FERMENTACIÓN LÍQUIDA										
No. de cepa	Clave	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA					MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA	
		Forma	Borde	Elevación	Color	Textura	Formación de halo (h)	Gram		Morfología
1	IL2A2	C	E	X	B	V	72	+	Cocos	-
2	IL4A2	C	E	X	B-t	V	72	+	Cocos	-
3	IL6A1	C	E	X	B-t	V	86	+	Cocos	-
4	IL6A2	C	E	P	B-t	V	86	+	Cocos	-

C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa

**Tabla 10.3.6. Morfología macroscópica, microscópica y prueba de catalasa de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas y purificadas de la fermentación sólida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco.**

FERMENTACIÓN SÓLIDA										
No. de cepa	Clave	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA					MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA		PRUEBA DE CATALASA	
		Forma	Borde	Elevación	Color	Textura	Formación de halo (h)	Gram		Morfología
5	IS6A1	C	E	P	B-t	V	86	+	Cocos	-
6	IS6A3	C	E	X	B	V	72	+	Cocos	-
7	IS10A2	C	E	X	B	V	72	+	Cocos	-
8	IS12A1	C	E	P	B-t	V	86	+	Cocos	-

C= circular, E= entero, P= plana X= convexa, B= blanco, B-t= blanco transparente, V= viscosa



#### 10.4. Medios de cultivo.

##### \* Agar MRS (Difco)

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de proteasa No. 3	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Dextrosa	20,0
Polisorbato 80	1,0
Citrato de amonio	2,0
Acetato de sodio	5,0
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2,0
Agar	15,0

pH =  $6.5 \pm 0.2$  Suspender 70 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

##### \* Agar MRS- Almidón

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona pancreática de caseína (OXOID)	10,0
Extracto de carne (OXOID)	10,0
Extracto de levadura (OXOID)	5,0
Almidón (J. T. Baker)	20,0
Citrato diamoniaco (J. T. Baker)	2,17
Acetato de sodio (J. T. Baker)	5,0
Sulfato de magnesio heptahidratado (SIGMA)	0,207
Sulfato de manganeso (SIGMA)	0,056
Fosfato dipotásico (Mallinckrodt)	2,62
Agar bacteriológico (Bacto)	15,0

pH =  $6.8 \pm 0,2$  Disolver en agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.



---

---

★ **Caldo MRS (Difco)**

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de proteasa No. 3	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5,0
Dextrosa	2,0
Polisorbato 80	1,0
Citrato de amonio	2,0
Acetato de sodio	5,0
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2,0

pH =  $6.5 \pm 0,2$  Suspender 55 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

★ **Agar cuenta en placa (Difco)**

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Digerido pancreático de caseína	5,0
Extracto de levadura	2,5
Dextrosa	1,0 g.
Agar	15,0 g.

pH =  $7,0 \pm 0,2$  Suspender 23,5 g del polvo en 1L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.



---

---

★ **Agar papa dextrosa (OXOID)**

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Extracto de papa	4,0
Glucosa	20,0
Agar	15,0

pH =  $5,6 \pm 0,2$  Suspender 39 g del polvo en 1L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir hasta su completa disolución. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

★ **Agar bilis rojo violeta (Difco)**

Componente	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3,0
Peptona	7,0
Sales biliares No.3	1,5
Lactosa	10,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002

Suspender 41.5 g del polvo en 1L de agua. Calentar la mezcla agitándola frecuentemente y hiérvala durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Enfríe la mezcla hasta 45-50 °C y utilícela inmediatamente. No utilizar autoclave. Se usa para el aislamiento y la diferenciación de microorganismos entéricos.



---

---

## 11.0. BIBLIOGRAFÍA

- Agati P., Guyot J., Morlon-Guyot P. y Hounhouigan D. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (*mawe and ogi*) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85:512-20.
- Amann R. y Kühn M. 1998. In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 69:25-36.
- Ampe F., Ben O., Moizan N., Wachter C. y Guyot J. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican *pozol*, a maize-fermented dough demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5464-5473.
- Ampe F. y Miambi E. 2000. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *Int. J. Food Microbiol.* 60:91-97.
- Antranikian G. 1990. Physiology and enzymology of thermophilic anaerobic bacteria degrading starch. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:201-218.
- Anuradha R., Suresh K. y Venkatesh K. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process. Biochem.* 1999. 35:367-75.
- Axelsson L. 1994. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S. y von Wright A. Editorial Marcel Dekker, Inc., New York, 20-27 pp.



- 
- Badui S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta Edición, Editorial Pearson Education, México.
  - Ben O. y Ampe F. 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough *pozol*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9):3664-3673.
  - Blandino A., Al-Aseeri M., Pandiella S., Canterob D. y Webba C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research Int.* 36:527-543.
  - Boyer C. y Shannon J. 1987. Carbohydrates of the kernel. En: *Corn Chemistry and Technology*. Watson S. A. y Ramstad P. E. Editorial American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul Minnesota, 253-272 pp.
  - Busse J., Denner E. y Lubitz W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. *J. Biotech.* 47:3-38.
  - Camacho A., Giles M., Ortegón A., Palao M., Serrano B. y Velázquez O. 2007. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. UNAM.UAM.
  - Carr J., Chill D. y Maida N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology.* 28(4):281-370.
  - Chatterjee M., Chakrabarty L., Chattopadhyay D. y Mandal K. 1997. Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. *Biotech. Lett.* 19:873-4.
  - Cheng P., Muller R., Jaeger S., Bajpai R. y Jannotti E. 1991. Lactic acid production from enzyme thinned cornstarch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. Ind. Microbiol.* 7:27-34.
  - Cruz-Ulloa S. y Ulloa M. 1973. *Rev. Soc. Mex. Historia Natural* 34:423.



- 
- 
- Daeschel M., Anderson R. y Fleming H. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:357-367.
  - Datta R. y Henry M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:1119-29.
  - Dendy A. y Bogdan J. Cereales y Productos Derivados y tecnología. 2001. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, 339-342 pp.
  - Díaz G. y Wachter C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 45:1-2.
  - Díaz G., Guyot J., Teran F., Morlon-Guyot J. y Wachter C. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in *pozol*, a Mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.* (69)8:4367-4374.
  - Erdman M., Bergen W. y Readdy C. 1977. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:901.
  - Esquivel K. 2012. Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
  - Flores T. 1996. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
  - Giraud E., Lelong B. y Raimbault M. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:96-9.
  - Gopal R., Altaf M., Naveena B., Venkateshwar M. y Vijay K. 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation- A review. *Biotechnol. Advances.* 26:22-24.



- 
- 
- Guadarrama K. 2007. Tipificación de bacterias lácticas aisladas del *Axocotl*, atole agrio de la sierra norte de Puebla, por medio de ARDRA. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
  - Guyot P., Calderon M. y Morlon-Guyot J. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *J. Appl. Microbiol.* 88:17-82.
  - Herrera T. 1993. Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En Alimentos Fermentados Indígenas de México. Wachter C. y Lappe P. 1993. UNAM, C.U. México D.F. 21-26 pp.
  - Hoschke A., Biacs P. y Beczner J. 1984 Symp. Importance of lactic fermentation in the food industry. UNIDO-UAM-ICAITIIMETA México city, November.
  - Hoseney R. 1991. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España, 87-89 pp.
  - Jensen P. y Hammer K. 1993. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12): 4363-4366.
  - Mac Faddin J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera Edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 73-81 pp.
  - Manual API 50CH de BioMérieux, S. A. Ref 50 300. 07945F-XL-2002/11. Francia.
  - Martínez-Cuesta. 1997. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lyses induced by a crude bacteriocin. *Int. J. Food Microbiol.* 38(2-3):125-131.



- 
- 
- Mandigan M., Martinko J. y Parker J. 2004. Biología de los microorganismos. Décima Edición, Editorial Pearson Educación, S. A., Madrid. 58-75 pp.
  - Mönckeberg F. 1988. Producción microbiana industrial. Fermentación. La revolución de la bioingeniería. Editorial Mediterráneo.
  - Museo Nacional de Culturas Populares. 1982. Recetario Mexicano de Maíz. Cultura SEP, México D. F.
  - Nakamura L. 1981. *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriolm.* 31:56-63.
  - Nwankwo D., Anadu E. y Usoro R. 1989. Cassava fermenting organisms. *MIRCEN J.* 5:169-79.
  - Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. México.
  - Norma oficial mexicana NOM-111-ssa1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. México.
  - Norma oficial mexicana NOM-113-ssa1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. México
  - Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". México.
  - Oguntoyinbo F. y Narbad A. 2012. Molecular characterization of lactic acid bacteria and in situ amylase expression during traditional fermentation of cereal foods. *Food Microbiol.* 31:254-262.
  - Pelczar M., Chan E. y Krieg N. 1993. Microbiology concepts and applications. Primera Edición, Editorial McGraw-Hill, México, 57-60 pp.



- 
- 
- Reyes P. 1990. El maiz y su cultivo. Primera Edición, Editorial AGT editor, 22-27 pp.
  - Rodriguez-Sanoja R., Morlon-Guyot J., Jore J., Pintado J., Juge J., Guyot P. 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3350-3356.
  - Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centuti3n D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A. y Eslava C. 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 71:169-176.
  - Salminen S. y Von Wright A. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Ltd., New York, 211-442 pp.
  - Sanni A., Morlon-Guyot J. y Guyot J. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 72:53-62.
  - Serna L. y Rodr3guez A. 2006. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs. *lactis* isolated from sugar cane plants. *J. Biotechnol.* 9:1-10.
  - Simago C. y Rukure G. 1992. Survival of enteric pathogens in traditional fermented foods. *J. Appl. Bacteriol.* 73:37-40.
  - Stainer R., Ingraham J., Wheelis M. y Painter P. 1992. Microbiolog3a. Segunda Edici3n, Editorial Revert3s, Espa3a, 530-539 pp.
  - Steinkraus K. 1993. Microorganismos, Alimentos y el Hombre. En: Alimentos Fermentados Ind3genas de M3xico. Wachter C. y Lappe P. UNAM, C.U. M3xico D.F. 1-4 pp.



- 
- 
- Steinkraus, K. 1994. Nutritional significance of fermented foods. *Food Research Int.* 21:259-267.
  - Stiles M. y Holzapfel W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
  - Tsao G., Cao N. y Cong C. 1999. Production of multifunctional organic acids from renewable sources. *Adv. Bioeng. Biotechnol.* 65:245-77.
  - Ulloa M., Herrera T. y Lappe P. 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. *Serie de Investigaciones Sociales*. Instituto Nacional Indigenista. 16:13-20.
  - Ulloa M. y Herrera T. 1976-1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: *pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache*. Instituto de biología, UNAM, Serie botánica 145-163.
  - Valderrama P. y Ramírez C. 1993. Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter C. y Lappe P. UNAM, C.U. México D.F.
  - Van N. y Hahn-Hagerdal B. 1999. Nutrient requirements of *Lactococci* in defined growth media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(5):617-627.
  - Velázquez R., Raimbault M. y Viniegra-González G. 1984. Symp. Importance of Lactic Fermentation in the Food Industry. UNIDO-UAM-ICAITI-IMETA. México, November.
  - Vihinen M. y Mäntsälä K. 1989. Microbial amyolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 24(4):329-418.



- 
- 
- Villegas J. 1995. Estrategias para la obtención de una cepa hiperproductora de exo polisacáridos en bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 50 pp.
  - Viniegra G. 1993. Oportunidades para las fermentaciones indígenas del maíz. En Alimentos Fermentados Indígenas de México. Wachter C. y Lappe P. UNAM, C.U. México D.F. 29-33 pp.
  - Wachter C., Cañas A., Bárzana E., Lappe P., Ulloa M. y Owens D. 2000. Microbiology of Indian and Mestizo *pozol* fermentations. *Food Microbiol.* 17: 251-256.
  - Wachter C. y Lappe P. 1993. Alimentos Fermentados Indígenas de México. UNAM, C.U. México D.F.
  - Zhang D. y Cheryan M. 1994. Starch to lactic acid in a continuous membrane reactor. *Process Biochem.* 29:145-50.