



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA
DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL
POZOL DURANTE LA FERMENTACIÓN
LÁCTICA DE MASAS Y SUSPENSIONES
DE HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

QFB. MARTHA GILES GÓMEZ

Tutor: DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE



MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL
POZOL DURANTE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DE MASAS Y SUSPENSIONES
DE HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADAS.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:**

QFB. MARTHA GILES GÓMEZ

ASESOR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTORAL ASIGNADO

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

Facultad de Química, UNAM

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 324,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
CONJUNTO "E", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	Dr. Carlos Alberto Eslava Campos	Facultad de Medicina, UNAM
SECRETARIO:	Dr. Gerardo Saucedo Castañeda	Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa
SUPLENTE:	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM
SUPLENTE:	Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Para el desarrollo del presente trabajo se contó con los siguientes financiamientos:

BECA CONACYT PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE MAESTRÍA CON NÚMERO DE REGISTRO 90461

BECA DGAPA-UNAM, PROYECTO DE INVESTIGACIÓN IN210194.

PROYECTO CONACYT 49687-Z.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Comité Tutorial del presente proyecto y de esta persona: Dr. Eduardo Bárzana, Dr. Gerardo Saucedo y Dra. Carmen Wachter, su opinión, apoyo y sugerencias contribuyeron al desarrollo del mismo, aportaron líneas de investigación y lo concretaron.

Especial agradecimiento a la M. C. María del Rocío Santillana Hinojosa, por el enorme apoyo académico y técnico en las técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia y compartir conocimientos en esta área.

Al Dr. Epifanio Cruz, del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, por el apoyo técnico para la esterilización por radiación Gamma de los sustratos.

A la Dra. Luz Elena Cervantes del Instituto de Nutrición Salvador Zubirán, por la donación de la cepa *Klebsiella pneumoniae* aislada de un paciente infantil con cuadro diarreico.

A la Dra. Biserka Svestarova† por la donación de la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Especiales agradecimientos a: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, Dr. Carlos Eslava, Dr. Mauricio Trujillo, Dr. Francisco Ruíz y Dra. Amelia Farrés, cuya revisión y corrección del presente estudio contribuyeron a un enriquecimiento invaluable para su conclusión.

Mi eterna gratitud a la Dra. Carmen Wachter, mi tutora.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dra. Carmen Wachter. Ha sido para mí un honor el haber compartido mi formación bajo tu manto. Me has enseñado a ser crítica, exigente en lo académico, a tener paciencia, respeto y mesura. Un agradecimiento infinito por confiar en aquéllos tiempos y formarme contigo como Profesor de la disciplina que nos apasiona: la microbiología aplicada a los alimentos. Gracias en la actualidad y en el pasado no remoto por confiar en mí y considerarme una colaboradora para una revisión, para un capítulo del libro, para dar una conferencia, al cubrir tus clases. Y no menos importante por insistir en la conclusión y esa infinita paciencia.

Dr. José Adelfo Escalante Lozada. La otra parte de mi formación, idea de pensamiento y actitud académica te la debo a ti Dr., gracias eternas por compartir tus conocimientos, por nunca dejar de estar presionando para ser mejor profesionista, ha sido muy enriquecedor las discusiones en este ámbito, con ellas se han aclarado puntos, se han modificado ideas y también se han generado defensas, argumentos científicos y un criterio propio. Gracias por ayudarme con el tema de las lácticas, los datos, la información, por la ayuda en la edición de este trabajo...Pero sobre todo por estar convencido o dejarte convencer de ver en mí una muy buena Maestra formada, colega y colaboradora.

MC. Rocío Santillana. Mi infinita gratitud por todo lo que me apoyaste académicamente durante el desarrollo del proyecto, por tu enseñanza en el HPLC, en la microbiología de las lácticas, por tu amistad. Sabes que eres una amiga invaluable, en esta época se encuentran las amistades de por vida, y encontramos identidad en pensamiento y opinión.

A la UNAM, a la Facultad de Química, a México.

DEDICATORIAS

A mi misma, por ser cada vez mejor, cada vez mas fuerte, por valorarme cada vez más.

A mi esposo, con el infinito amor de por vida que te tengo. Es un reto bipolar estar contigo, enamorarte y enamorarme día a día, conservar los lazos, perdonar, luchar brazo con brazo. Gracias por la familia linda que tenemos. Toda ella inspira a siempre ser un mejor ser humano.

A mi Gigo, mil gracias mi amado hijo, también hiciste la maestría conmigo, aún recuerdo cuando estabas a mi lado esperando a que terminara mis experimentos. Gracias por todo tu apoyo, por tu tranquilidad y tu carácter. Finalmente logré que seas todo un hombre, en extremo responsable y paciente. Eres un bello ser.

A mis inmensamente amadas Xi y Vi, son una bendición de personitas. Cada día me sorprende y estimula la enorme dedicación y su pasión para todos sus deberes. Gracias por todo el amor que me tienen y demuestran. Estar con ustedes me alegra infinitamente, mejora mi día. Fueron un regalo doble de la vida, del cielo.

A mi mamá y mi papá, por las bases que me dieron. Por estar ahí. Mami, eres la mujer que más admiro en la vida, todo lo has logrado siendo una buena persona, todo con amor, siempre has perdonado, confiado y ayudado. Pa+: un muy buen ejemplo de persona trabajadora, me ayudaste a ser fuerte, me heredaste la facilidad por la docencia. Gracias por ayudarme siempre, desde donde estés síguelo haciendo. Es muy difícil olvidarte y perdonarme por las ausencias. A mis hermanos: Male, Nacho y Meche. Los quiero muchísimo, gracias por todo lo vivido juntos.

A mis tres hijos, los tres son un orgullo para mí. Es un trabajo muy gratificante ser su mamá.

A Rocío, Andrea, Elsa Lynch; Julio y Rina. Gracias por su amistad, por sus consejos, por su apoyo, por esas largas charlas de amigos y también no quitar el dedo del renglón. Cada uno de ustedes con una personalidad y carácter que complementa al mío propio. Agradezco profundamente su presencia y amistad en mi vida.

Rodolfo muchísimas gracias por tu apreciación a mi persona, a mi valía como académico. Muchos proyectos los confiaste a mí...gracias por pensar que puedo dar siempre más, es mucho compromiso, pero los resultados siempre son gratificantes, gracias por tus consejos, tengo bien presente el ser siempre el ejemplo para mis hijos. Pilar, Atziri, Anto, Lau, Adriana y Aurora, son unas excelentes personas y colegas, me han ayudado mucho, siempre estoy saturada y siempre me ayudan en sus posibilidades a cumplir mis deberes, sueños y metas. Gracias por su compañía en el Depto. De Biología. Ale Camacho eres un súper amigo, mil mil mil gracias por todo tu apoyo, comprensión y ayuda, es increíble a estas fechas como trabajamos con enorme coordinación.

A todos los valientes alumnos que han confiado en mí como Profesora y tutora... no es fácil la "Profesora Giles".

PENSAMIENTOS

Dios vive en mi... como yo.

A fool's brain digests philosophy into folly, science into superstition, and art into pedantry.... hence University education." George Bernard Shaw.

El presente trabajo muestra en los seres vivos más sencillos, el admirable trabajo de la Naturaleza: la evolución y los fenómenos que la originan. Encontré hace ya tiempo estas frases del autor del "Origen de las Especies". Considero totalmente aplicable al tema que se manejó aquí:

In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed (A lo largo de la historia de la humanidad -y de los animales también- aquéllos que han aprendido a colaborar e improvisar mas eficientemente han prevalecido).

It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change (No es el más fuerte de las especies el que sobrevive, tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es aquel que es más adaptable al cambio). *El Origen de las Especies, Cap. V.*

I have called this principle, by which each slight variation, if useful, is preserved, by the term of Natural Selection (He llamado a este principio, por el cual cada pequeña variación, si útil, es preservada, con el término de Selección Natural).

Charles Darwin

Contenido

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. BACTERIAS LÁCTICAS.....	8
2.2. FILOGENIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.	9
2.3. <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Pediococcus</i>	12
2.4. METABOLISMO.....	14
2.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS GENERADOS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS.	20
2.6. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES.	23
2.7. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES A BASE DE MAÍZ	25
2.8. MICROBIOTA NATURAL EN ALIMENTOS FERMENTADOS.	28
2.9. <i>POZOL</i>	31
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES	34
3.1. MICROBIOLOGÍA DEL <i>POZOL</i>	34
CAPÍTULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	39
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	42
5.1. HIPÓTESIS.....	42
5.2. OBJETIVO GENERAL.....	43
5.3. OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
6.1. Sustratos	44
6.1.1. Masas de harina de maíz nixtamalizado.	44
6.1.2. Suspensiones esterilizadas de harina de maíz nixtamalizado.....	45
6.2. Microorganismos.	46
6.2.1. Bacteria láctica.....	46
6.2.2. Enterobacterias.....	46
6.3. Conservación de las cepas.	47
6.4. Preparación de los inóculos.	48
6.4.1. Bacteria láctica.....	48

6.4.2.	Enterobacterias.....	48
6.5.	Fermentaciones.....	49
6.5.1.	Fermentaciones de masas de harina de nixtamal.....	50
6.5.2.	Fermentaciones de suspensiones de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas.....	50
6.6.	Muestreo.....	56
6.7.	Análisis microbiológicos.....	56
6.7.1.	Preparación y dilución de la muestra para en análisis microbiológico.....	56
6.7.2.	Cuantificación de grupos microbianos.....	57
6.8.	Análisis fisicoquímicos.....	58
6.8.1.	pH.....	58
6.8.2.	Concentración de ácidos orgánicos.....	58
6.9.	Análisis estadístico.....	60
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		61
7.1.	Efecto de la microbiota natural de la masa de harina de nixtamal en la permanencia de las enterobacterias.....	61
7.1.1.	Fermentación de masas de harina de nixtamal no esterilizadas sin inocular.....	61
7.1.2.	Fermentaciones de masas de harina de nixtamal no esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	62
7.1.3.	Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con <i>L. plantarum</i> Pz-9 y <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	64
7.2.	Efecto de las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación láctica en la permanencia de las enterobacterias durante la fermentación de masas de harina de nixtamal.....	73
7.2.1.	Masas esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i>	73
7.2.2.	Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de un caso de diarrea infantil.....	74
7.3.	Efecto antimicrobiano del ácido láctico en la sobrevivencia de las enterobacterias del <i>pozol</i> en suspensiones de harina de nixtamal.....	83
7.3.1.	Suspensiones inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 y agitadas a 100 r.p.m.....	83
7.3.2.	Suspensiones esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i> y agitadas a 100 r.p.m.....	85
7.3.3.	Suspensiones esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i> , agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.....	87

7.3.4.	Suspensiones esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de un caso de diarrea infantil, agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.	88
7.3.5.	Suspensiones esterilizadas inoculadas con <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028, agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.	89
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		99
8.1.	Conclusiones	99
8.2.	PERSPECTIVAS	100
BIBLIOGRAFÍA		101
ANEXO I. IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS CON EL SISTEMA API 20E®.....		110
ANEXO II. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) AL EMPLEAR LA PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY CON EL USO DEL PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 5.		112

Índice de tablas

Tabla 2.1.	Diferenciación de bacterias lácticas	10
Tabla 2.2	Redefinición del grupo <i>Lactobacillus</i>	15
Tabla 2.3.	Clases de bacteriocinas producidas por LAB.	23
Tabla 2.4.	Algunos alimentos fermentados tradicionales elaborados a base de maíz.	27
Tabla 6.1	Concentración de ácido láctico adicionada en cada tiempo de fermentación a las suspensiones 20% (P/V) esterilizadas, agitadas (100 r.p.m.) e inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del pozol o <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de un caso de diarrea.	55
Tabla 6.2.	Concentración de ácido láctico adicionada en cada tiempo de fermentación a las suspensiones 20% (P/V) esterilizadas, agitadas (100 r.p.m.) e inoculadas con <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028. .	55
Tabla 7.1.	Variaciones en la concentración de ácido láctico y pH durante la evaluación de la permanencia y/o eliminación de enterobacterias en fermentaciones de masa de harina de nixtamal bajo diferentes condiciones.	70
Tabla 7.2.	Variaciones en la concentración de ácido láctico y pH durante la evaluación de la permanencia y/o eliminación de enterobacterias en fermentaciones de suspensiones de harina de nixtamal al 20% (P/V) esterilizadas y agitadas a 100 r.p.m., con adición externa de ácido láctico.	93
Tabla A.I.1.	Tabla de lectura. Componentes, reacciones/enzimas y resultados de lectura para las diferentes pruebas incluidas en el sistema de API20E ® (BioMérieux).....	111
Tabla A.II.1.	Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en masas de harina de nixtamal comercial en presencia y/o ausencia de la microbiota nativa, sin inocular o inoculadas con los grupos microbianos de estudio.	112
Tabla A.II.2.	Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en masas de harina de nixtamal comercial esterilizadas e inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 aislado del pozol y con las enterobacterias empleadas en el estudio.	113

Tabla A.II.3. Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en suspensiones de harina de nixtamal inoculadas con las enterobacterias empleadas en el estudio con adición externa de una concentración equivalente de ácido láctico al generado por *L. plantarum* Pz-9. ... 114

Índice de figuras

Figura 2.1.	Árbol consenso de las principales línea bacterianas.	11
Figura 2.2	Principales grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias Gram-positivas relacionadas con bajo % G+C y alto % G+C.	12
Figura 2.3.	Árbol filogenético de Lactobacillales basados en los alineamientos de proteínas ribosomales.....	13
Figura 2. 4.	Metabolismo homofermentativo de bacterias lácticas.	16
Figura 2.5.	Metabolismo heterofermentativo en bacterias lácticas.	17
Figura 2.6.	Vías alternativas de utilización de piruvato en bacterias lácticas.	18
Figura 2.7.	<i>Pozol</i> . Tipos de pozol encontrados en el mercado de San Cristóbal de las Casas, Chis.	31
Figura 6.1.	Metodología seguida en las fermentaciones realizadas en masas de harina de maíz nixtamalizado comercial. La concentración final de sólidos fue 46% (P/V).	53
Figura 6.2.	Metodología seguida en las fermentaciones realizadas en suspensiones de harina de maíz nixtamalizado comercial. La concentración final de sólidos fue 20% (P/V).	54
Figura 7.1.	Fermentación de masas no esterilizadas sin inocular.	62
Figura 7.2.	Fermentación de masas no esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.	63
Figura 7.3.	Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	65
Figura 7.4.	Concentración de enterobacterias en presencia o ausencia de la microbiota natural durante la fermentación en masas de harina de maíz nixtamalizado.	68
Figura 7.5.	Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i>	74
Figura 7.6.	Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de un caso de diarrea infantil.	75
Figura 7.7.	Concentración de las enterobacterias respecto a las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación láctica generada por <i>L. plantarum</i> Pz-9, en masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas.	76
Figura 7.8.	Fermentación de suspensiones esterilizadas inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> Pz-9 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.	84
Figura 7.9.	Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i>	86
Figura 7.10.	Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada del <i>pozol</i> con adición externa de ácido láctico.	88
Figura 7.11.	Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de un caso de diarrea infantil con adición externa de ácido láctico	89

Figura 7.12. Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 con adición externa de ácido láctico.....	90
Figura 7.13. Desarrollo de enterobacterias respecto a la concentración equivalente de ácido láctico producido durante la fermentación láctica en suspensiones de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas. ...	91
Figura A.I.1. Esquema de inoculación e interpretación de la galería API 20E®.	110

RESUMEN

El *pozol* es un alimento fermentado tradicional de origen maya elaborado a partir de masa de maíz nixtamalizada fermentada. En este alimento se desarrolla una fermentación natural con la microbiota contenida en el sustrato y la microbiota incorporada durante el proceso de elaboración. La presencia y desarrollo de bacterias lácticas en el alimento origina una fermentación láctica, y se generan condiciones y/o metabolitos desfavorables para las enterobacterias. Este grupo sin embargo, persiste durante la fermentación, lo cual afecta la inocuidad de este alimento. Para estudiar las posibles causas de la permanencia de enterobacterias en el *pozol*, se realizaron fermentaciones en condiciones controladas de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizado en sustratos esterilizados y no esterilizados, inoculados con bacterias lácticas y enterobacterias representativas de su género.

Se evaluó el desarrollo de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en masas no esterilizadas, no inoculadas, e inoculadas con *Lactobacillus plantarum* aislado del *pozol*, y se comparó la permanencia de la enterobacteria en masas esterilizadas e inoculadas con la bacteria láctica. Al transcurrir la fermentación se observó la disminución en la concentración de las enterobacterias y al final no se detectó la presencia en masas esterilizadas, en cambio en masas no esterilizadas se observó su permanencia. Esto indicó que a pesar del desarrollo de la bacteria láctica, la microbiota natural de la harina de maíz nixtamalizado favorece la presencia de *S. Typhimurium*. De manera similar, la microbiota compleja del *pozol* podría favorecer la permanencia de las enterobacterias.

Para determinar el efecto antimicrobiano de la bacteria láctica aislada del *pozol* sobre las enterobacterias, se realizaron fermentaciones en masas esterilizadas e inoculadas con *L. plantarum* del *pozol*. Se comparó la permanencia de *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol* con la de una cepa de *K. pneumoniae* aislada de un caso diarreico y de *S. Typhimurium*. Durante las fermentaciones la cepa aislada *pozol* sobrevivió más tiempo que la cepa aislada del caso diarreico y que *S. Typhimurium*. Esto sugirió que las enterobacterias aisladas del alimento se encuentran habituadas a las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación siendo otra de las posibles razones por las cuales se presenta la presencia de este grupo.

Las bacterias lácticas producen principalmente ácido láctico como parte de su metabolismo. Durante las fermentaciones en masas, el ácido láctico fue el principal metabolito detectado. Se evaluó la permanencia de las enterobacterias frente al efecto bactericida de este compuesto, se determinó el desarrollo de cada cepa de *K.*

pneumoniae y *S. Typhimurium* en suspensiones esterilizadas y agitadas de nixtamal a las cuales se les adicionó una concentración equivalente de ácido láctico a la producida en una fermentación. A pesar de que se agregó una cantidad equivalente para las tres cepas evaluadas, se observó únicamente la estabilidad de *K. pneumoniae* aislada del *pozol* frente al compuesto. Esto indicó que las concentraciones de ácido láctico generadas por *L. plantarum* son suficientes para la eliminación de enterobacterias. Sin embargo, las enterobacterias aisladas del *pozol*, se encuentran adaptadas a las condiciones ácidas generadas durante la fermentación.

Con los resultados anteriores existen dos causas que favorecen la singular estabilidad de enterobacterias en este alimento fermentado:

1. La existencia de una microbiota compleja que ayuda a su persistencia.
2. El ácido láctico generado durante la fermentación, sería suficiente para la eliminación de las enterobacterias, sin embargo, la adaptación de las cepas nativas del alimento a las condiciones generadas, impide su eliminación.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El *pozol* es un alimento fermentado de origen maya elaborado a partir de masa de maíz nixtamalizada fermentada que es consumido tradicionalmente desde épocas antiguas en el Sureste de México. En este alimento se desarrolla una fermentación natural con la microbiota contenida en el sustrato y la microbiota incorporada durante el proceso de elaboración (principalmente durante la molienda).

Uno de los principales grupos presentes en el *pozol* son las bacterias lácticas. La presencia y desarrollo de bacterias lácticas en el alimento origina una fermentación láctica. Tradicionalmente en los alimentos fermentados donde se desarrollan estos microorganismos, y durante este proceso metabólico se generan condiciones y/o metabolitos desfavorables para algunos grupos microbianos, lo cual ayuda a la eliminación de los mismos, por lo cual son considerados seguros para su ingesta.

También se ha reportado la presencia de enterobacterias en el *pozol*. Dentro de los miembros del grupo de las enterobacterias destacan aquéllos géneros y especies empleados como indicadores de inocuidad (grupo coliforme) y microorganismos patógenos, como los patotipos de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica*, etc. Por lo cual este grupo en muchos de los alimentos donde están presentes se les considera como indeseables debido a que comprometen la inocuidad.

En el *pozol* las enterobacterias persisten durante todo el proceso fermentativo. Se reportó su permanencia inusual desde los primeros trabajos, a pesar del desarrollo del grupo de bacterias lácticas y de existir decrementos en el pH por la generación de acidez. En estudios más recientes, se emplearon metodologías moleculares como el DGGE para monitorear la presencia de los grupos microbianos en el *pozol* y se observó la misma característica en el desarrollo y la permanencia de las enterobacterias, así como de las bacterias lácticas con una consecuente fermentación láctica. Sin embargo estos trabajos no se enfocaron a estudiar cuáles son las causas que originan esta persistencia, sin ser el tema principal de discusión.

La persistencia inusual de enterobacterias durante la fermentación de un alimento a pesar de que se efectúa una fermentación láctica como lo es el *pozol*, resulta en consecuencia determinante para la seguridad de los consumidores de este alimento fermentado tradicional, ya que no se genera su eliminación con el proceso fermentativo. Por lo que en el presente estudio se estudiaron algunas causas que originan la persistencia del grupo de enterobacterias en este alimento fermentado tradicional.

De manera general los estudios experimentales se realizaron en condiciones controladas. Se elaboraron masas o suspensiones de harina de maíz nixtamalizado comercial como una estrategia para tener un modelo similar al *pozol*, en estas masas o suspensiones (en algunos casos esterilizadas por radiación Gamma), se inocularon los microorganismos empleados en el estudio y se incubaron bajo condiciones similares a las temperaturas climáticas con las que se efectúa la fermentación para obtener el alimento.

Como inóculos representativos de su género se emplearon cepas aisladas del *pozol*: *Lactobacillus plantarum* que sería utilizado como bacteria láctica y *K. pneumoniae* como enterobacteria, además se usó *K. pneumoniae* aislado de un caso de diarrea infantil y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

En la primera parte de este trabajo se presentan las generalidades del tema de investigación. Dado que uno de los grupos principales dentro de la microbiota que conforma al *pozol*, se menciona al grupo de las bacterias lácticas, las características del grupo, su taxonomía actualizada, el metabolismo que presentan haciendo énfasis en la fermentación láctica. Se describen así mismo los antimicrobianos que producen y como los generan. Ya que el *pozol* es un alimento fermentado tradicional se menciona este tema, su importancia y potencial de explotación y se describen algunos de los alimentos fermentados tradicionales que emplean como sustrato el maíz. En este tipo de alimentos es característico que la fermentación es realizada por la microbiota natural contenida en los sustratos, por lo cual se incluye el papel primordial que posee ésta en la generación de los alimentos fermentados tradicionales. El último tema que se incluye en las generalidades es el *pozol* donde se describe qué es y como se elabora, así como los cambios organolépticos y nutricionales que ocurren en la fermentación.

La segunda parte de esta tesis incluye los antecedentes del tema de estudio. En esta parte se incluye un resumen de los trabajos de investigación que se describen en la literatura con respecto al *pozol*. Se describe la microbiota que ha sido descrita en diversos reportes en este alimento, en este sentido se menciona con detalle los géneros y especies de enterobacterias y de bacterias lácticas que se han aislado e identificado en él por diversas aproximaciones.

En la siguiente sección del trabajo escrito se incluye el planteamiento del problema, donde se describe el papel de las bacterias lácticas en este alimento y algunos parámetros como el pH que se ha detectado con el transcurso de la fermentación. Se describen así mismo la información escasa de varios reportes en cuanto a los niveles y especies de enterobacterias que se han detectado, y se enfatiza el desarrollo de este grupo en

alimentos fermentados tradicionales de maíz africanos como el *kenkey*, *mahewu* y *ogi*, para finalizar con la característica inusual de la estabilidad en los niveles de enterobacterias en el *pozol*, razón por la cual el objetivo de este trabajo es indagar en las causas de la permanencia de este grupo.

En los materiales y métodos se incluyeron la aproximación metodológica para investigar el tema de estudio. Se incluyen los sustratos empleados, los microorganismos y su origen, se describen de manera general la forma en que se elaboraron las fermentaciones. Finalmente se describen la metodología empleada para realizar los diversos análisis microbiológicos y los análisis fisicoquímicos empleados en el estudio. De forma breve, en este contexto se elaboraron masas de harina de maíz nixtamalizado comercial o suspensiones del mismo sustrato, lo anterior como un modelo de estudio bajo condiciones controladas tratando de similar lo que ocurre durante la fermentación del *pozol*. En estos sustratos esterilizados o sin esterilizar se agregaron los microorganismos empleados en el estudio.

La sección de resultados y discusión se presenta en tres partes. En la primera parte se presentan los resultados al estudiar el papel de la microbiota natural de las masas de harina de maíz nixtamalizado. En el *pozol* además de las enterobacterias y las bacterias lácticas, hay otros grupos microbianos que se desarrollan durante la fermentación y que están naturalmente contenidas en las masas de nixtamal., por lo cual se considera que posee una microbiota compleja. La presencia del consorcio microbiano global podría contribuir a la viabilidad de los grupos microbianos que lo conforman.

Se estudió el desarrollo de las enterobacterias durante la fermentación, en presencia de otros grupos de microorganismos, como lo son las bacterias lácticas naturalmente contenidas en las masas de harina de maíz nixtamalizado. Además se incluyen los resultados de masas no esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium*, se decidió emplear masas no esterilizadas como estrategia para incluir a la microbiota natural contenida en la harina de maíz nixtamalizado, y que pudieran contener a otros miembros del consorcio microbiano. También se reportan los resultados de las fermentaciones con masas elaboradas con harina de maíz nixtamalizado estéril que se inocularon con la bacteria láctica y *S. Typhimurium*; o bien la bacteria láctica y *K. pneumoniae* aislada de un caso clínico. En general para todas las fermentaciones aunque en mayor o menor grado se generó ácido láctico debido al desarrollo de la microbiota láctica y descendió el pH. Se encontró la persistencia del grupo de enterobacterias naturales de la harina o bien inoculadas en las masas no esterilizadas, es decir en presencia de la microbiota natural. Esta persistencia no se presentó en las masas esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica y la enterobacteria. La diferencia en las fermentaciones en masas es la

presencia de la microbiota natural, ya que no estaban esterilizadas, con lo cual se demostró que esta microbiota en general tiene un papel protector que contribuyó a la permanencia de enterobacterias.

En este alimento gracias al desarrollo de las bacterias lácticas generan condiciones que no favorecerían el desarrollo de los microorganismos de prueba, debido a los metabolitos que produce este grupo microbiano. Por lo cual, en la segunda parte de este proyecto se investigó si estas condiciones antimicrobianas son suficientes para la eliminación de las enterobacterias utilizadas. Se emplearon masas elaboradas con harina de maíz nixtamalizado esterilizado. En todas estas masas se inoculó *L. plantarum*, y particularmente a cada una se inoculó también *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* aislado de un caso clínico ó *K. pneumoniae* aislado del *pozol* y se compararon el desarrollo de las enterobacterias en ellas. *L. plantarum* se desarrolló de manera similar en todas las masas esterilizadas e inoculadas y se produjeron cantidades similares de ácido láctico y el pH disminuyó también de manera similar. Durante la fermentación se eliminaron *S. Typhimurium* y la enterobacteria aislada del caso clínico, pero no se observó la eliminación de la enterobacteria aislada del *pozol*, y las células viables de ésta permanecieron en números altos durante las 96 horas de fermentación. Esto indicó que las condiciones antimicrobianas son suficientes para suprimir y erradicar a las enterobacterias en general, pero la enterobacteria aislada del *pozol* posee una estabilidad a estas condiciones generadas durante la fermentación.

El principal metabolito que se cuantificó durante la fermentación en masas esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica fue el ácido láctico, que tiene actividad antimicrobiana. Por este motivo en la última parte del estudio se realizaron fermentaciones en suspensiones de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas, inoculadas por separado con cada una de las enterobacterias. A cada una de estas, se le agregó una concentración de ácido láctico similar al producido en las fermentaciones en masas inoculadas con *L. plantarum*. Con la adición del ácido láctico se observó el decremento en el pH en forma similar en todas las fermentaciones. En las suspensiones se observó que *S. Typhimurium* y *K. pneumoniae* aislada del caso clínico fueron eliminadas, en cambio *K. pneumoniae* aislada del *pozol* resistió la concentración de ácido láctico agregado y el decremento en el pH. Esto indicó que el ácido láctico que se genera por esta bacteria láctica ayuda a la eliminación de enterobacterias no originarias del *pozol*, pero que *K. pneumoniae* aislada del *pozol* está excepcionalmente habituada a estas condiciones.

Para evaluar si las diferencias observadas mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) se realizó un análisis de varianza (ANOVA), se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones comparadas. Los resultados del ANOVA fueron consistentes con las observaciones discutidas.

Resumiendo los resultados anteriores existen dos causas que favorecen la singular sobrevivencia de enterobacterias en este alimento:

3. La existencia de una microbiota compleja en el *pozol* que ayuda a la persistencia de las enterobacterias.
4. Las condiciones antimicrobianas y el ácido láctico generado durante la fermentación en el *pozol* serían suficiente para la eliminación de las enterobacterias, sin embargo, la estabilidad de las enterobacterias nativas del alimento a las condiciones generadas, impide su eliminación.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (LAB) son un grupo de microorganismos Gram-positivos que comparten características fisiológicas, metabólicas y morfológicas. Son bacilos o cocos no esporulados, producen ácido láctico como principal producto final del metabolismo de carbohidratos. Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el centro del grupo, aunque también se consideran como bacterias lácticas: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. El género *Bifidobacterium* aunque no está filogenéticamente relacionado, se considera generalmente como bacteria láctica (Figura 2.2) (Khalid, 2011; Stiles y Holzapfel, 1997).

La clasificación de este grupo se basa principalmente en su morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad de crecer en altas concentraciones de sal y su tolerancia al ácido o álcali. Así mismo se emplea la composición de ácidos grasos y componentes de pared celular. Además en la taxonomía actual se emplean relaciones filogenéticas verdaderas basadas en las secuencias del RNA ribosomal (Figura 2.2; Tabla 2.1) (Khalid, 2011; Axelsson, 1998).

Orla-Jensen denominó a las bacterias lácticas como “un gran grupo natural”, debido a la creencia que estos microorganismos estaban filogenéticamente relacionados y separados de otros grupos. En aquella época, únicamente los caracteres fenotípicos eran examinados y evaluados como marcadores filogenéticos. Actualmente, se tienen métodos para examinar, en detalle, las macromoléculas celulares, siendo más exactas en definir las relaciones y posiciones filogenéticas (Khalid, 2011). La filogenia de las bacterias debe basarse en la comparación de moléculas altamente conservadas y presentes en todos los microorganismos. Los genes que codifican para el RNA ribosomal, que contienen dominios conservados y variables, fueron seleccionados para los estudios filogenéticos. La comparación de las secuencias de RNAr es en la actualidad la técnica más poderosa para determinar el grado de relaciones filogenéticas entre los microorganismos. Se emplean las secuencias de los genes 16S o 23S para este propósito, y con las similitudes y diferencias observadas, se han creado árboles filogenéticos (Holzapfel *et al.*, 2001).

Los datos de las secuencias del RNAr 16S de pediococos y lactobacilos claramente indicaron que los taxa generados con base en propiedades fenotípicas, como la morfología celular y el tipo de fermentación, no corresponden a la ramal filogenética. En consecuencia, ciertas especies de bacterias lácticas debieron ser reclasificadas. El reto hasta el momento para los taxónomos, es encontrar características fácilmente determinables que correlacionen con el agrupamiento filogenético. Esto se ha tornado en un tópico importante en la clasificación de los microorganismos (Holzapfel *et al.*, 2001).

2.2. FILOGENIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

La clasificación de LAB tradicionalmente incluye ciertas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* (*Streptococcus*), *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Los cambios basados en estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos han generado cambios importantes en su nomenclatura. Filogenéticamente las LAB pertenecen a la rama de los Clostridia dentro de las bacterias Gram-positivas. La mayoría de los géneros pertenecen al orden *Lactobacillales*. Son catalasa-negativas, que tienen al menos el 55% de contenido G+C en su DNA. Esto aleja a las bacterias lácticas “tradicionales” de las bifidobacterias las cuales tienen más del 55% de contenido G+C en el DNA (Figura 2.1), y por lo tanto, pertenecen al ramal de Actinomicetales (Khalid, 2011; Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Stiles y Holzapfel, 1997).

Las bacterias lácticas de importancia en alimentos pertenecen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Los datos de RNAr 16S para las bacterias lácticas consideran nuevos grupos dentro de la taxonomía, aunque no todos estos se han incluido. Las consideraciones filogenéticas recientes indican que los lactobacilos, leuconostocs y pediococos pueden reclasificarse como los tres grupos principales: el grupo de *Leuconostoc*, el grupo de *Lactobacillus delbrueckii* y el grupo de *Lactobacillus casei-Pediococcus* (Tabla 2.2). Las bacterias lácticas de los nuevos géneros *Carnobacterium* (lactobacilos atípicos, sensibles al ácido), *Tetragenococcus* (antes *Pediococcus halophilus*) y *Vagococcus* (antes estreptococos móviles) forman un *cluster* filogenético distinto con el género *Enterococcus*. Algunas de estas relaciones se indican en la Figura 2.2 (Holzapfel *et al.*, 2001; Axelsson, 1998; Schleifer y Ludwig, 1995).

Tabla 2.1. Diferenciación de bacterias lácticas

Tipo fermentativo/Género	Morfología	Tipo de ácido láctico formado	CO ₂ de glucosa	Fermentación de ribosa	Fermentación de gluconato	Hidrólisis de arginina
Homofermentativos						
<i>Streptococcus</i>	Cocos/cadenas	L+	–	(–/+)	ND	V
<i>Pediococcus</i>	Cocos/tetradas	DL, L+	–	(V)	–	V
<i>Lactococcus</i>	Cocos/cadenas	L+	–	–	–	V
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos/pares	D–, L+, DL	–	(+/-) ^{a,b}	(+/-) ^{a,b}	–
Heterofermentativos						
Betabacteria (<i>Lactobacillus</i>)	Pares/cadenas	D, L	+	+	+	+
<i>Leuconoctoc</i>	Pares/cadenas	D(–)	+	(V)	(–/+)	–

+, positivo; –, negativo; (+/-), mayoría positivo, ocasionalmente negativo; (-/+), mayoría negativo, ocasionalmente positivo; V, variable; L+, levo-ácido láctico; D(–), dextro- ácido láctico; DL, mezcla de ácido láctico D y L; ND, datos no disponibles (Modificado de Carr *et al.*, 2002; Axelsson, 1998).

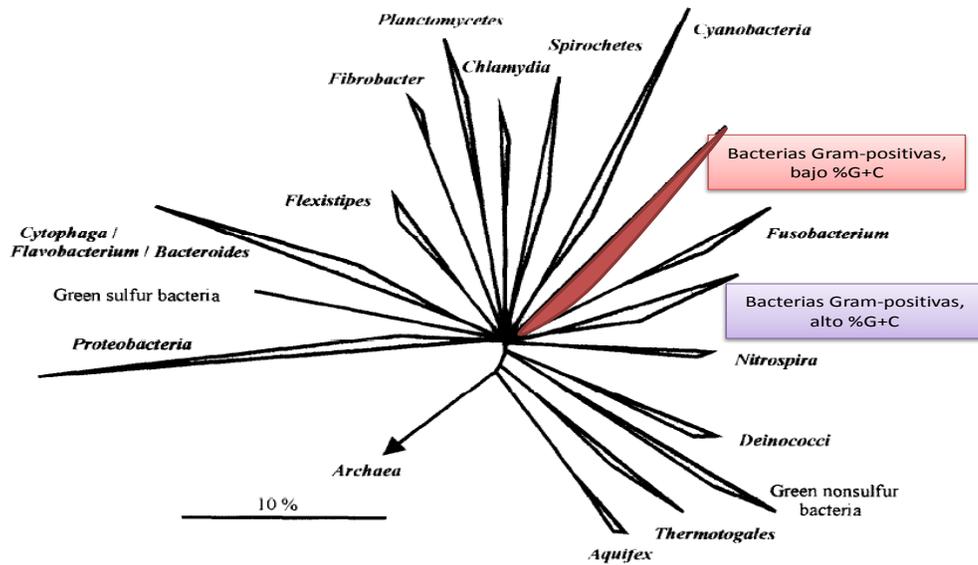


Figura 2.1. Árbol consenso de las principales líneas bacterianas.

Se resalta en el brazo rojo, la ramal de los Clostridia (Bacterias Gram-positivas bajo %G+C), donde pertenecen la mayoría de los géneros de bacterias lácticas. El recuadro en azul muestra la ramal de las actinobacterias (Bacterias Gram-positivas alto %G+C) donde pertenecen las bifidobacterias (Modificado de Stiles y Holzapfel, 1997).

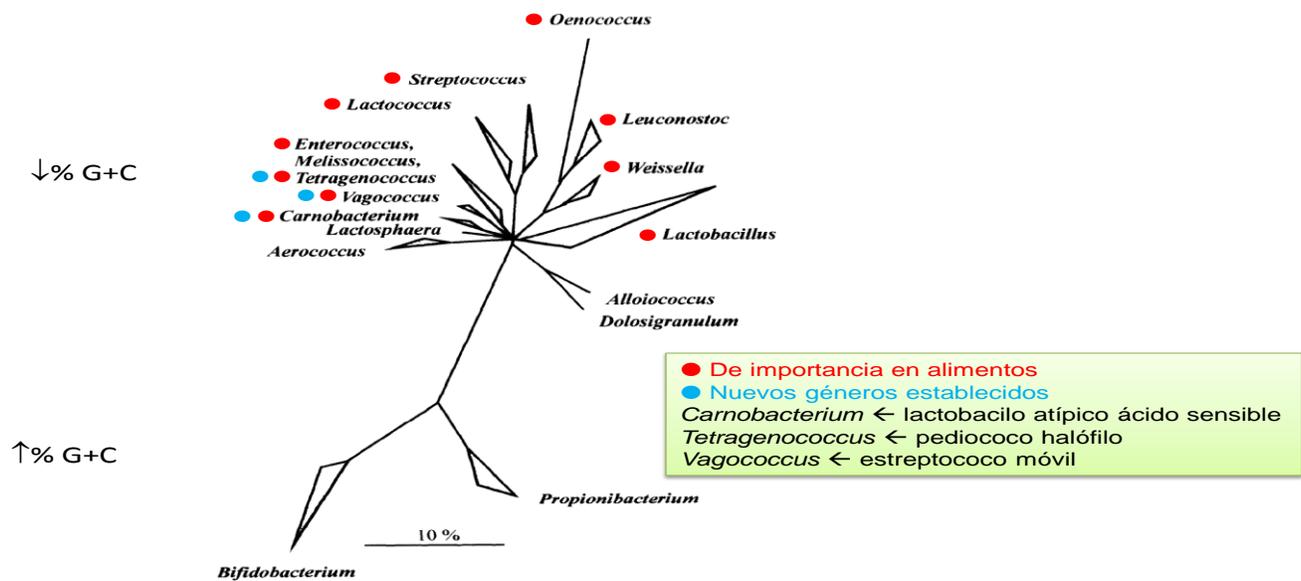


Figura 2.2 Principales grupos filogenéticos de bacterias lácticas y bacterias Gram-positivas relacionadas con bajo % G+C y alto % G+C.

(Modificado de Holzapfel *et al.*, 2001; Schleifer y Ludwig, 1995).

2.3. *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

Con las aproximaciones fenotípicas estos tres géneros se consideraban diferentes con poca posibilidad de relación. Sin embargo, los estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos mostraron que hay una relación estrecha entre los tres. Los principales grupos basados en estudios del RNAr 16S se resumen a continuación: (1) Grupo de *L. delbrueckii* incluyendo principalmente los lactobacilos homofermentativos; (2) El grupo *L. casei-Pediococcus*, que comprende a los lactobacilos homofermentadores estrictos, así como los heterofermentadores facultativos y estrictos; (3) El grupo *Leuconostoc*, que incluye algunos de los lactobacilos heterofermentadores estrictos, fue posteriormente subdividido en tres géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*. Esta subdivisión se muestra en la Figura 2.3 (Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Carr *et al.*, 2002).

Los lactobacilos son estrictamente fermentativos y tienen requerimientos nutricionales complejos. Crecen en y están asociados a muchos hábitats, como alimentos, tractos respiratorio, gastrointestinal y genital de humanos y

animales, así como en ensilados y vegetales. Pertenecen al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*. Dentro del género se incluyen 106 especies validadas, siendo el género mas numeroso dentro de los *Lactobacillales* (Felis y Dellaglio, 2007). Son acidúricos o acidófilos y disminuyen el pH a 4.0 en los alimentos que contienen carbohidratos fermentables. En consecuencia a este decremento, por lo general evitan el desarrollo o eliminan otras bacterias. Se desarrollan a un pH máximo de 7.2, aunque existen excepciones. El género *Lactobacillus* es heterogéneo, y tienen un % G+C en el DNA del 30 al 55% (Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Axelsson, 1998).

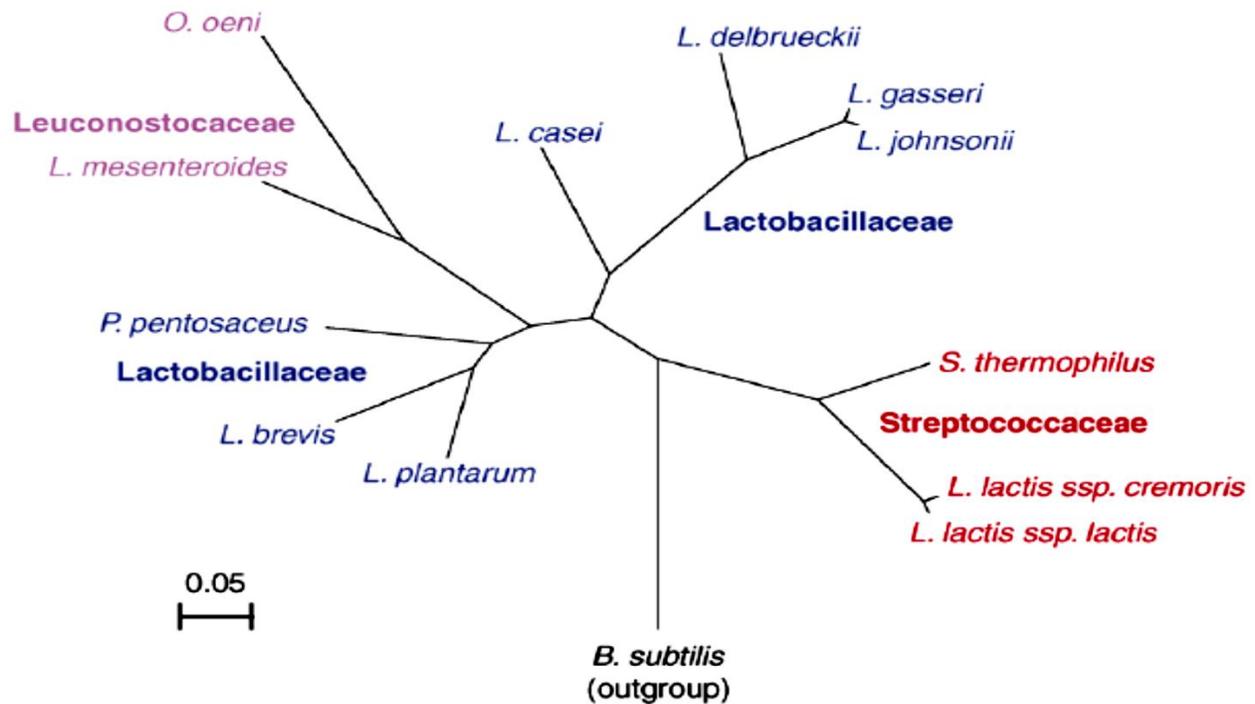


Figura 2.3. Árbol filogenético de Lactobacillales basados en los alineamientos de proteínas ribosomales.

Los colores representan la taxonomía actual, con *Lactobacillaceae* en azul, *Leuconostocaceae* en violeta y *Streptococcaceae* en rojo (Pfeiler y Klaenhammer, 2007).

En el estatus taxonómico actual y con base en la subdivisión fenotípica clásica se agrupan en: Grupo I, que incluye a los lactobacilos homofermentativos que fermentan glucosa exclusivamente a ácido láctico y no fermentan pentosas o gluconato. Son representativos del mismo, las termobacterias Orla-Jensen y las especies importantes asociadas en alimentos *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* y *L. helveticus* así como *L. farciminis* y *L. kefiranofaciens* (Felis y Dellaglio, 2007).

El Grupo 2 incluye a los lactobacilos heterofermentativos que fermentan hexosas a ácido láctico y pueden producir gas del gluconato pero no a partir de la glucosa. También fermentan pentosas por una fosfocetolasa inducible para producir ácido láctico y ácido acético. Especies importantes asociadas en alimentos pertenecientes a este grupo incluyen *L. casei* y *L. plantarum*. Así mismo, se ha propuesto un tercer subgrupo de los lactobacilos pertenecientes al grupo II que incluyen a *L. curvatus* y *L. sake*, quienes se encuentran asociados de manera importante con alimentos (Felis y Dellaglio, 2007).

El Grupo 3 incluye a los lactobacilos heterofermentativos que fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético y/o etanol y dióxido de carbono. La producción de gas a partir de la glucosa es una característica de estas bacterias. Dentro de este grupo se encuentran *L. sanfrancisco*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. kéfir*, *L. reuteri*, *L. bif fermentans*, *L. fructivorans*, *L. buchneri*, *L. viridescens* (ahora *Weisella viridescens*). Los lactobacilos heterofermentativos que carecen de ácido aspártico o ácido diaminopimélico en su peptidoglicano fueron agrupados filogenéticamente con *Leuconostoc paramesenteroides* dentro del nuevo género *Weisella* (Tabla 2.2) (Felis y Dellaglio, 2007).

2.4. METABOLISMO

La característica esencial del metabolismo de las LAB es la fermentación eficiente de carbohidratos acoplada a la fosforilación a nivel de sustrato. Las LAB muestran una enorme capacidad de degradar distintos carbohidratos y compuestos similares. El producto final de la fermentación es el ácido láctico, sin embargo, las LAB se pueden adaptar a distintas condiciones y cambiar su metabolismo, generalmente origina una amplia diversidad en productos finales de la fermentación (Khalid, 2011; Axelsson, 1998).

Entre las bacterias lácticas se pueden distinguir dos vías fermentativas principales a partir de hexosas: la glucólisis (vía Embden-Meyerhof), la cual genera casi exclusivamente ácido láctico como producto final bajo condiciones estándar, y se le conoce como fermentación homoláctica, y la vía del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa) que genera cantidades significativas de otros productos finales como etanol, acetato y CO₂, además del ácido láctico y se le conoce como fermentación heteroláctica. Diferentes condiciones de crecimiento pueden alterar significativamente la formación de los productos finales por algunas bacterias lácticas. Estos cambios se pueden atribuir a la alteración del metabolismo del piruvato y/o al empleo de aceptores de electrones externos, como el oxígeno o compuestos orgánicos (Khalid, 2011; Carr *et al.*, 2002; Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

Tabla 2.2 Redefinición del grupo *Lactobacillus*.

Grupo filogenético	Grupo fermentativo 1 Homofermentativos obligados	Grupo fermentativo 2 Heterofermentativos facultativos	Grupo fermentativo 3 Heterofermentativos obligados
<i>Grupo Delbruekii</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i> , <i>bulgaricus</i> y <i>lactis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgrantum</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>L. hamsterii</i>	
Grupo <i>Lactobacillus casei</i>-<i>Pediococcus</i>	<i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i> y <i>aviarius</i> , <i>L. farcimins</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i> y <i>salivarius</i> , <i>L. sharpae</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>P. dextranicum</i> , <i>P. parculus</i>	<i>Lactobacillus agilis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. bifermentans</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> y <i>torquens</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> y <i>tolerans</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> (<i>L. bavaricus</i>), <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. raccimostercus</i> , <i>L. vaginales</i>
Grupo <i>Leuconostoc</i>			<i>Lactobacillus fructosus</i> , <i>Weisella confusa</i> (<i>L.</i> <i>confusus</i>), <i>W. (L.) viridescens</i> , <i>W. (L.) halotolerans</i> , <i>W. (L.) hilgardii</i> , <i>W. (L.) kandleri</i> , <i>W. (L.) minor</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. (Leuconostoc) paramesenteroides</i> , <i>Leuconostoc amelobiosum</i> , <i>L. argentumum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>L. carnosum</i> , <i>L. geludum</i> , <i>L. fallax</i>

(Modificado de Axelsson, 1998)

La glucólisis (vía Embden Meyerhof), es utilizada por casi todas las LAB excepto los leuconostoc, lactobacilos del grupo 3, oenococos y weisellas. Se caracteriza por la formación de fructosa 1,6-bifosfato, la cual es escindida por una fructosa bifosfato aldolasa en dihidroxiacetona fosfato, y gliceraldehído-3-fosfato, éste último (y la dihidroxiacetona fosfato vía gliceraldehído-3-fosfato), se convierte a piruvato. Bajo condiciones normales, *i.e.*, exceso de carbohidrato y acceso limitado al oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , reoxidando el NADH formado en los pasos iniciales. Se obtiene un balance redox, el ácido láctico es virtualmente el único producto final, y el proceso metabólico se refiere como fermentación homoláctica (Figura 2.4) (Carr *et al.*, 2002; Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

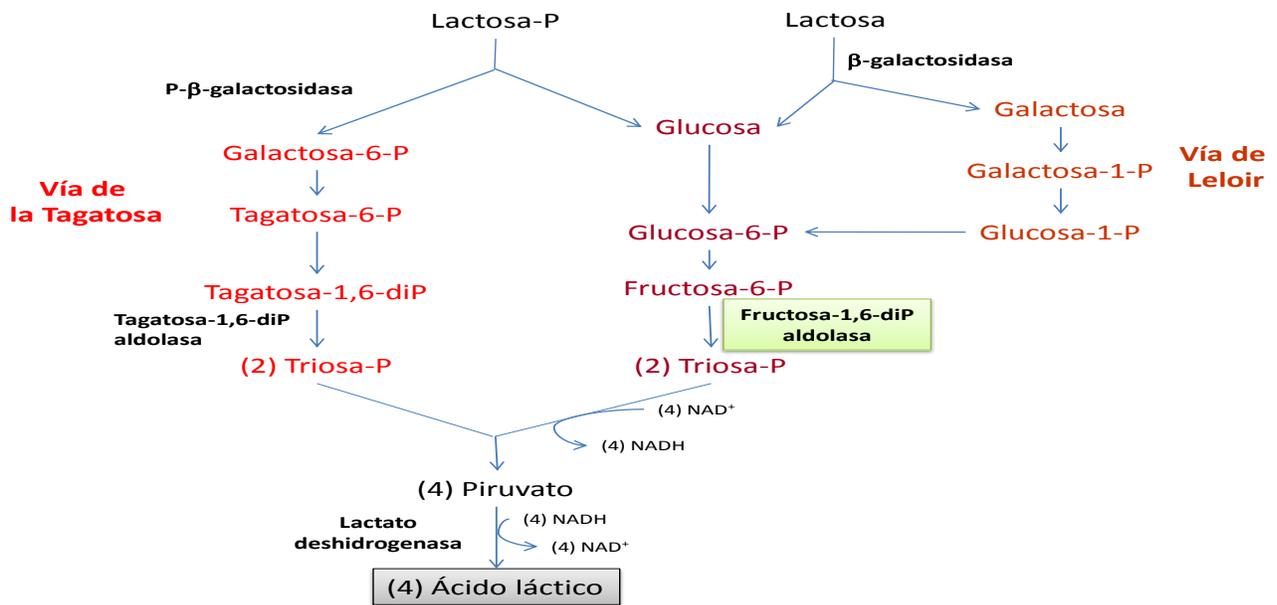


Figura 2. 4. Metabolismo homofermentativo de bacterias lácticas.

(Khalid, 2011; Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998;).

La gran mayoría de LAB fermenta otras hexosas distintas a la glucosa, como manosa, galactosa y fructosa. Los carbohidratos ingresan a las vías principales a nivel de la glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de una isomerización y/o fosforilación. En el caso del metabolismo de galactosa, algunas LAB como, *L. lactis*, *E. faecalis* y *L. casei*, utilizan un sistema de fosfotransferasa para el ingreso de este carbohidrato, y la galactosa-6-fosfato formada por este mecanismo, es metabolizada a través de la vía de la tagatosa-6-fosfato (Poolman, 2002; Axelsson, 1998). La tagatosa es el estereoisómero de la fructosa, requiere enzimas diferentes para su

metabolismo. Esta vía coincide con la glucólisis a nivel del gliceraldehído-3-fosfato. Muchas cepas en esta categoría tienen también la capacidad de transportar galactosa con una permeasa y convertirlas a glucosa-6-fosfato a través de la vía de Leloir. Esta ruta también es empleada por LAB-fermentadoras de galactosa que transportan este carbohidrato con una permeasa y que carecen del sistema PTS para el transporte de galactosa (Khalid, 2011; Poolman, 2002; Axelsson, 1998).

La otra vía fermentativa importante, es la vía del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (conocida también como vía de las pentosas-fosfato, vía de las pentosas fosfocetolasa, vía de las hexosas monofosfato, vía del 6-fosfogluconato). Esta vía se caracteriza por incluir pasos iniciales de deshidrogenación sobre la glucosa, con la formación del 6-fosfogluconato, seguido de una descarboxilación. La pentosa-5-fosfato resultante se escinde por una fosfocetolasa en gliceraldehído-3-fosfato y acetilfosfato. El gliceraldehído-3-fosfato se metaboliza de manera similar por la vía glucolítica y se forma ácido láctico. Cuando no hay aceptores de electrones adicionales, el acetilfosfato se reduce a etanol vía acetylCoA y acetaldehído. Debido a que esta ruta, además del ácido láctico, origina cantidades significativas de otros productos finales (CO_2 y etanol), se le conoce como fermentación heteroláctica (Figura 2.5) (Khalid, 2011; Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

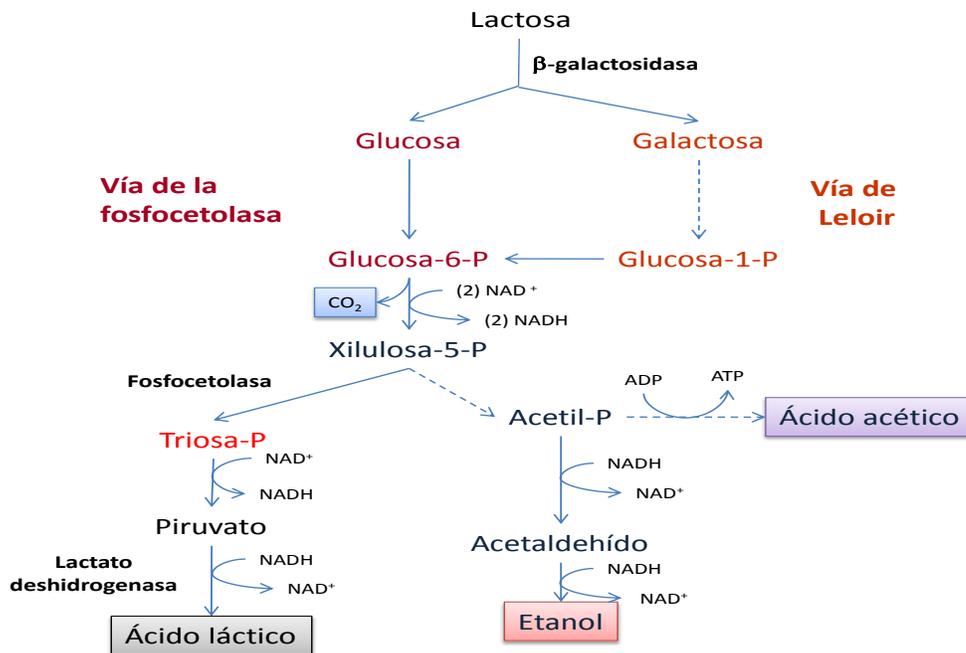


Figura 2.5. Metabolismo heterofermentativo en bacterias lácticas.

(Khalid, 2011; Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson 1998).

Las LAB pueden cambiar su metabolismo en respuesta a distintas condiciones y se generan diferentes productos finales a los observados con la fermentación de glucosa bajo condiciones normales. En la mayoría de los casos, esta variación se puede atribuir a un cambio en el metabolismo del carbohidrato, al empleo de aceptores externos de electrones, o a ambos. Bajo ciertas condiciones las LAB emplean vías alternativas para utilizar el piruvato en lugar de reducirlos a ácido láctico. Estas vías se presentan en la Figura 2.6. Diversas especies pueden emplear diferentes rutas, dependiendo de las condiciones y la capacidad enzimática. Algunas de estas reacciones se efectúan inclusive en condiciones normales de fermentación de la glucosa, y funcionan entonces como un papel anabólico. Por ejemplo, la formación de acetilCoA se requiere para la biosíntesis de lípidos (Axelsson, 1998).

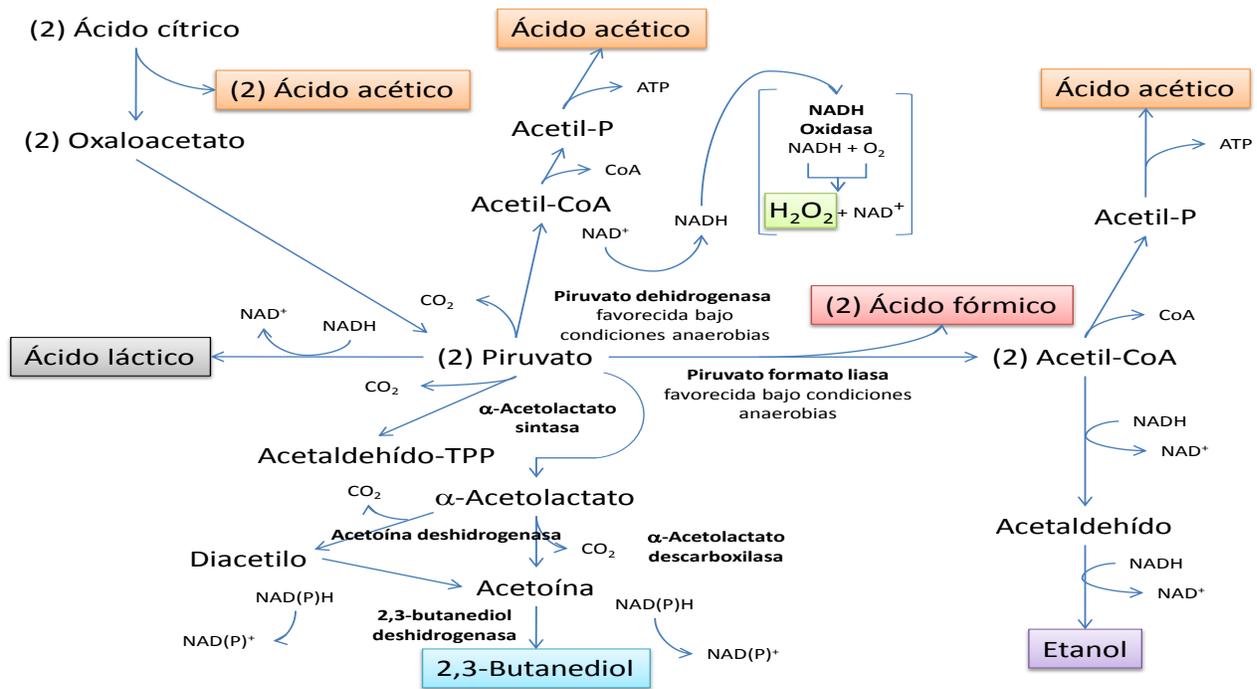


Figura 2.6. Vías alternativas de utilización de piruvato en bacterias lácticas.

(Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

La vía que origina el diacético (aroma a mantequilla) y acetoína/2,3-butanediol (Figura 2.6) es común entre las bacterias lácticas. Esta ruta se presenta de forma significativa, únicamente si existe un exceso de piruvato en la célula relativo a la necesidad de regeneración de NAD⁺. Lo anterior puede ocurrir cuando existen diferentes carbohidratos fermentables en el medio o bien, cuando existe un aceptor de electrones alternativo. En general

las concentraciones bajas del carbohidrato y pH bajos favorecen la formación de diacetilo/acetoína. El diacetilo se forma por una descomposición del α -acetolactato (no enzimática). Esta reacción se favorece por aireación y bajo pH. La acetoína y/o 2,3 butanediol se produce en cantidades mucho mayores al diacetilo pero no contribuye al aroma (Caplice y Fitzgerald, 1999; Axelsson, 1998).

Otra rama del metabolismo del piruvato consiste en el sistema de piruvato-formato-liasa (Figura 2.6). La enzima piruvato formato liasa cataliza la reacción de piruvato y CoA a formato y acetil CoA. Este último puede ser empleado como aceptor de electrones, generando etanol. Los productos finales formados son lactato, acetato, formato y etanol. Se forman mayores cantidades de los productos principales de la vía (acetato, formato y etanol) cuando disminuye la velocidad de crecimiento, o en un estado de escasez parcial de nutrientes, causado por limitación de sustrato o la naturaleza de éste. Este sistema funciona únicamente en condiciones anaerobias, ya que la enzima es extremadamente sensible al oxígeno, presuntamente la enzima se inactiva cuando las células son expuestas al aire (Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

El oxígeno tiene un profundo efecto en el destino del piruvato en LA, mediado directamente por la piruvato oxidasa, o indirectamente a través de reacciones de oxígeno con enzimas conteniendo flavinas NADH:H₂O₂ oxidasa y NADH:H₂O oxidasa. La piruvato oxidasa convierte el piruvato a CO₂ y acetilfosfato con la formación de H₂O₂. Se ha sugerido estar presente en el metabolismo aerobio de *Lb. plantarum*, que forma cantidades significativas de ácido acético aeróbicamente (Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

Vía de la piruvato deshidrogenasa. El complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa está activo en lactococos. Este complejo genera acetil CoA, pareciéndose al sistema de piruvato formiato liasa. El sistema tiene un papel anabólico en la producción de acetil CoA para la síntesis de lípidos bajo condiciones aeróbicas (Figura 2.6). Anaeróbicamente este papel es probablemente efectuado por la piruvato formiato liasa que posee la ventaja de no reducir NAD⁺ en el proceso. Al exponerse al oxígeno el sistema piruvato formiato liasa se inactiva (Caplice y Fitzgerald 1999; Axelsson, 1998).

Fuerza protón motriz y pH interno. El metabolismo de las bacterias lácticas se auxilia mediante la generación de ATP, o compuestos ricos en energía intercambiables con ATP. Los eventos mas importantes que requieren energía en las células son la síntesis de macromoléculas así como el transporte de solutos esenciales en contra del gradiente de concentración. El metabolismo celular genera un gradiente de protón electroquímico a través de la membrana citoplásmica. El sistema más común para generar un gradiente de protones es la cadena

transportadora de electrones asociada a la membrana. El flujo de electrones a través del sistema hacia diferentes acarreadores bombea protones fuera de la célula. El gradiente de protones a través de la membrana citoplásmica se compone de dos partes, un potencial electroquímico negativo interno $\Delta\psi$, y un gradiente de ΔpH alcalino interno. Ambos son responsables de la generación de la denominada fuerza protón motriz (PMF). En organismos con cadena transportadora de electrones, esta fuerza se convierte en energía química, *i.e.*, ATP (Khalid, 2011; Axelsson, 1998).

Las bacterias lácticas no poseen cadena transportadora de electrones, de ahí que no puedan generar la energía por ese medio. El ATP se genera por fosforilación a nivel de sustrato, el cual es característico de todos los organismos fermentativos. Las LAB poseen una enzima muy similar a la ATP sintasa, pero el principal papel de esta enzima es la reacción inversa, *i.e.*, la hidrólisis de ATP con el bombeo de protones fuera de la célula. En estos microorganismos se establece la PMF que puede dirigir reacciones de consumo de energía como la internalización de metabolitos y iones (Khalid, 2011; van den Guchte *et al.*, 2002; Axelsson, 1998).

Las bacterias lácticas crean una fuerza protón motriz principalmente por medio de una H^+ -ATPasa membranal a expensas del ATP. La fuerza protón motriz dirige el transporte de metabolitos y iones dentro de la célula. El eflujo de productos finales del metabolismo y transporte electrogénico de ciertos compuestos puede contribuir a la formación de la fuerza protón motriz, generando ATP. El transporte de carbohidratos se media principalmente por los sistemas de permeasa dependiente de protones (fuerza protón motriz) o por los sistemas fosfotransferasa: fosfoenolpiruvato-carbohidrato. El transporte de aminoácidos y péptidos se media por sistemas dependientes de la fuerza protón motriz, o mediante sistemas de enlace a fosfato (Axelsson, 1998).

2.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS GENERADOS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

La habilidad de las LAB para producir sustancias antimicrobianas se ha empleado históricamente para conservar alimentos. La fermentación disminuye la cantidad de carbohidratos disponibles y genera una gama de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, los más comunes son los ácidos láctico, acético y propiónico. Además de esos metabolitos primarios, las LAB pueden generar otros productos (Caplice y Fitzgerald 1999; Ouwehand, 1998).

Ácidos Orgánicos. El ácido láctico se produce por homofermentación o bien el ácido láctico, acético, etanol y CO_2 en cantidades equimolares, a partir de la fermentación de hexosas, por heterofermentación. Los ácidos

orgánicos débiles tienen una actividad antimicrobiana mayor a pH mas bajo que a pH neutro. El ácido acético posee una actividad antimicrobiana mayor en contra de levaduras, mohos y bacterias. Esto se debe a su valor de pKa más alto comparado con el del ácido láctico (pKa 4.75 y 3.86, respectivamente). La molécula de ácido orgánico sin disociar es la forma tóxica de la molécula. La forma no disociada o neutra difunde a través de la membrana celular debido a que es liposoluble. Después de entrar a la célula el ácido se disocia debido a que el pH en el citoplasma está cercano a la neutralidad. La liberación de protones dentro del citoplasma conlleva a la acidificación y disipación del gradiente de pH sobre la membrana causando la inhibición en el crecimiento. Aunque también se postula que la acumulación del anión es la principal causa de la inhibición en el crecimiento, ya que reduce la velocidad de síntesis de macromoléculas y afecta el transporte en la membrana. Las LAB contrarrestan el efecto de acumulación de aniones reduciendo el pH de su citoplasma (Khalid, 2011; Servin, 2004; van den Guchte *et al.*, 2002; Caplice y Fitzgerald 1999; Ouwehand, 1998).

Peróxido de hidrógeno. En presencia de oxígeno, las LAB generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de flavoprotein oxidasas, NADH oxidasas y superoxido dismutasas. Las LAB no producen catalasa debido a la ausencia de una fuente de grupo prostético hem. Los sistemas que eliminan el peróxido de hidrógeno son menos activos que los que lo generan. Esto origina que el metabolito se acumule, aunque no en cantidades significativas *in vivo* debido a la descomposición por peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasas. El efecto bactericida del peróxido de hidrógeno se ha atribuido al fuerte efecto oxidante sobre la célula bacteriana, entre los compuestos que se afectan son los grupos sulfhidrilo de las proteínas y los lípidos de membrana. Así mismo, algunas de las reacciones de generación del peróxido de hidrógeno agotan el oxígeno y genera un ambiente anaerobio no favorable para algunos microorganismos (Khalid, 2011; Servin, 2004; van den Guchte *et al.*, 2002; Caplice y Fitzgerald 1999; Ouwehand, 1998).

Dióxido de carbono. El dióxido de carbono se forma principalmente durante la fermentación heteroláctica, aunque también se genera por otras rutas metabólicas. El dióxido de carbono tiene un doble efecto antimicrobiano. Su formación genera un ambiente anaerobio y la misma molécula tiene un efecto antimicrobiano. Aunque el mecanismo de actividad es desconocido, se considera que inhibe la descarboxilación enzimática, y su acumulación en la bicapa lipídica origina la disfunción en la permeabilidad de la membrana (Caplice y Fitzgerald 1999; Ouwehand, 1998).

Diacetilo. El diacetilo (2, 3-butanediona), tiene efecto antimicrobiano contra *Bacillus* sp. Es generado por especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* a partir del citrato vía

piruvato. Cuando se metabolizan las hexosas se inhibe la formación del diacetilo. Se ha observado que es más efectivo a $\text{pH} < 7.0$ y es más efectivo en contra de bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos que en contra de bacterias Gram-positivas. Se piensa que reacciona con la proteína de enlace a arginina de las bacterias Gram-negativas e interfiere con la utilización de este aminoácido (Servin, 2004; Caplice y Fitzgerald 1999; Ouwehand, 1998).

Sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular. Además del peso molecular, estos componentes comparten otras propiedades; 1) activas a pH bajo, 2) termoestables, 3) amplio espectro de actividad y 4) solubles en acetona (Ouwehand, 1998).

La reuterina (3-hidroxiopropanal) es generada por *Lactobacillus reuteri* al desarrollarse en condiciones anaeróbicas en medios con glucosa y glicerol o gliceraldehído al iniciar la fase estacionaria. La reuterina puede ser reducida a 1, 3-propanediol por la NADH-H^+ -deshidrogenasa. Al estar en contacto con bacterias susceptibles se estimula su producción. Se ha encontrado que tiene propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiprotozoarias y antivirales. Actúa a nivel de las enzimas con sitios sulfhidrilo. Posee efecto inhibitorio en la subunidad de enlace de la ribonucleótido reductasa e interfiere con la síntesis del DNA (Ouwehand, 1998). El ácido 2-pirolidon-5-carboxílico (PCA) o ácido piroglutámico es producido por *Lactobacillus casei* ssp. *casei* y *L. casei* ssp. *pseudopantarum* y *Streptococcus bovis*. Posee efecto inhibitorio contra *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas putida* (Caplice y Fitzgerald, 1999; Ouwehand, 1998).

Bacteriocinas. Son antibióticos termoestables de carácter proteico de bajo peso molecular, principalmente actúan en contra de otras bacterias y por lo general el microorganismo productor tiene un mecanismo de inmunidad específico frente a ellas. Las bacteriocinas producidas por las LAB pueden tener un amplio o estrecho espectro de acción, pero en general, su actividad es en contra de especies Gram-positivas de bajo % G+C. También se ha presentado actividad en contra de bacterias Gram-negativas, aunque en situaciones donde se ha afectado la integridad de la membrana (Cotter *et al.*, 2005). Se definen tres clases de bacteriocinas producidas por LAB (Tabla 2.3): 1) Lantibióticos; 2) Péptidos hidrofóbicos termoestables (<13,000 Da); 3) Proteínas termolábiles (>30,000 Da). Las bacteriocinas pueden ser adicionadas como conservadores (nisina) o pueden ser generadas *in situ*, *i.e.*, en el producto en el caso de cultivos iniciadores o en el tracto gastrointestinal en el caso de cepas probióticas (Cotter *et al.*, 2005; Ouwehand, 1998). Se ha observado que las bacteriocinas se adsorben a las células productoras, especialmente cerca de pH 6.0. La adsorción es menor a pH 1.5-2.0 (Savadojo *et al.*, 2006; Cotter *et al.*, 2005; Caplice y Fitzgerald, 1999; Ouwehand, 1998).

Tabla 2.3. Clases de bacteriocinas producidas por LAB.

Clase	Subclase	Descripción
Clase I		Lantibióticos
Clase II		Pequeñas (<10KDa), moderada (100°C) a alta termoestabilidad, no contienen péptidos lantibióticos activos en membrana
	IIa	Peptidos activos- <i>Listeria</i> con -Y-G-N-G-V-X-C próximos al extremo amino terminal
	IIb	Bacteriocinas bi-peptídicas
	IIc	Péptidos tiol-activados
Clase III		Proteínas (>30 KDa) termolábiles
Clase IV		Bacteriocinas complejas: proteínas con lípidos o carbohidratos

(Cotter *et al.*, 2005; Caplice y Fitzgerald, 1999; Ouwehand, 1998).

2.6. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES.

Un alimento se considera fermentado cuando uno o más de sus constituyentes han sido modificados por microorganismos específicos o sus enzimas para generar un producto final significativamente alterado pero deseable para consumo humano. El proceso fermentativo involucra mezclas de cultivos como mohos, levaduras o bacterias. Los alimentos fermentados tradicionales se consideran como una fuente 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. Los alimentos fermentados pueden ser consumidos como componentes importantes de la dieta como alimento básico, como complemento de la alimentación básica, como condimentos y o bien como bebidas (Steinkraus, 1986).

Algunas características benéficas de los alimentos fermentados incluyen (Steinkraus, 1986; Steinkraus, 1995):

- a) Conservación de una gran cantidad de alimento 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 bajo cierta condición.
- c) El valor nutritivo puede incrementarse, debido al enriquecimiento biológico del alimento con proteína, aminoácidos esenciales, 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.

Estos alimentos se originaron como una necesidad de mejorar la calidad en el almacenamiento de diversos alimentos vegetales y animales a través de fermentaciones ácidas, alcohólicas o alcalinas. La fermentación es un proceso de conservación eficiente de baja energía que mejora la digestibilidad, sabor, apariencia, contenido nutritivo y otros atributos de calidad, además de disminuir la concentración de componentes antinutritivos de los sustratos y el tiempo de cocción. Muchos alimentos fermentados tradicionales reciben actualmente atención mundial debido a sus efectos en mejora de la salud, prevención de enfermedades o efectos curativos, aunque la investigación de estas matrices como materia prima para los microorganismos probióticos es escasa en comparación con los alimentos fermentados lácteos. Existe poca información acerca de los retos de estos microorganismos para sobrevivir, el criterio para la fermentación, su uso como iniciadores y su relación con otros microorganismos. La información que se ha obtenido de su estudio y la investigación científica que en ellos se realiza ha ayudado al desarrollo de nuevos productos probióticos para la industria alimentaria, que es de utilidad en consumidores que rechazan el consumo de productos lácteos o cuando estos alimentos son inaccesibles. Existe una evidencia documental creciente en los efectos benéficos de los probióticos (Steinkraus, 1995).

Muchos alimentos fermentados tradicionales se han escalado a nivel industrial con fines comerciales, aunque la gran mayoría se producen aún a escala artesanal. Dichos productos generalmente contienen mezclas de géneros y poblaciones de microorganismos. El desarrollo de métodos moleculares ha ayudado a una caracterización más cercana de las cepas y desarrollo de productos fermentados de manera controlada (Rivera-Espinosa y Gallardo-Navarro, 2010; Nout *et al.*, 2007).

En muchos alimentos fermentados tradicionales se han identificado bacterias lácticas. Su capacidad de fermentación de carbohidratos y de generación de metabolitos antimicrobianos, así como la disminución de pH y la creación de condiciones desfavorables para el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos son algunas de las razones por las que se emplean ampliamente en la industria alimentaria como cultivos iniciadores y de que formen parte de la microbiota intestinal. En los alimentos fermentados tradicionales se han encontrado estas características en estudios *in vitro* (Nout *et al.*, 2007).

Algunos alimentos fermentados tradicionales se elaboran a partir de cereales. Inicialmente éstos se consumieron crudos, posteriormente fueron molidos con piedras y convertidos en papillas. Alrededor del 4,000 a.C. estas papillas se cocieron hasta presentar una consistencia de pan, lo cual resaltó el sabor, digestibilidad y almacenamiento. Una enorme cantidad de productos fermentados de cereal se han desarrollado a lo largo de la historia de la nutrición humana, pero solo recientemente se han reportado las características de los microorganismos probióticos implicados en estos productos. Las papillas ácidas se consumen en cantidades variables alrededor del mundo particularmente en países en vías de desarrollo, donde forman parte de la dieta básica (Steinkraus, 1995; Nout, *et al.* 2007).

Algunos de los ejemplos de estas papillas son: *Ogi* (Nigeria); *Uji* (Kenia); *Koko* (Gana); *Togwa* (Tanzania); *Obsuera* (Tanzania y Uganda); *Bogobe* (Botswana), *Nasha*, *Aceda*, *Raghida* o *Medida* (Sudán), *Ogibaba* (Nigeria), *Mawe* (Benin), *Ting* (Sudáfrica), *Fube* (Brasil) y *Chika* (Perú), las cuales son hechas de maíz, sorgo, mijo o yuca, seguidos de una molienda húmeda, tamizado húmedo y ebullición (Steinkraus, 1995).

2.7. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES A BASE DE MAÍZ

El maíz, aunque tiene un bajo valor nutritivo, es una de las fuentes más importantes de alimento para millones de personas, particularmente en Latinoamérica y África. De ahí que se hayan desarrollado métodos como la nixtamalización y la fermentación para mejorar la calidad nutricional de los productos a base de este cereal. Se ha demostrado que las LAB y levaduras son los microorganismos más importantes en la fermentación espontánea de este cereal y que generan alimentos fermentados ácidos (Tabla 2.4) (Steinkraus, 1997).

Ogi. Este desayuno popular y alimento complementario para niños en varios países del oeste de África se elabora a partir de maíz fermentado, sorgo o mijo. Para prepararlo, 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 para dar un sedimento almidonoso, blanco y ácido. La fermentación es efectuada por lactobacilos naturales del ambiente como: *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, aunque otras bacterias y levaduras también están implicadas. El *ogi* se diluye en agua hasta un 8 a 10% de sólidos y se hierve para convertirse en una papilla o se cuece para convertirlo en un gel espeso (*eko*) antes de consumirse. Se ha demostrado que este alimento posee actividad antimicrobiana contra bacterias que provocan diarrea (Chelule *et al.*, 2010; Nout *et al.*, 2007).

Uji. El *uji* es comúnmente conocido en el este africano, es una suspensión de harina de maíz, mijo, sorgo o yuca. Se prepara a partir de una sopa fresca cremosa la cual se fermenta antes o después de la cocción, con lo cual se obtiene una consistencia mas espesa. Se bebe directamente de una taza o en la mitad de una vasija elaborada de cáscara seca de calabaza. Es un componente importante del desayuno y el almuerzo. También se consume como alimento para ganancia de peso, bebida refrescante, o como guarnición y se cree que estimula la lactación. Además, se ingiere en ceremonias como circuncisión, bodas, bailes y labores comunes. Para elaborarlo, el maíz se muele finamente y se remoja en agua a una concentración del 30 % p/v. Se fermenta por 2 a 5 días a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) hasta alcanzar una acidez del 0.3 al 0.5% de ácido láctico. Se diluye hasta un 8 a 10% de sólidos y se hierve. Para luego ser diluído a 4 o 5% de sólidos y se endulza con aproximadamente 6% de sacarosa y se consume cuando aún está tibio. El pH oscila entre 3.8 y 4.4. En el proceso fermentativo típico del *Uji*, los coliformes dominan la fermentación por las primeras 16 a 24 horas. A partir de entonces los lactobacilos predominan, produciendo ácido suficiente para disminuir el número de coliformes. Se ha encontrado que *L. plantarum* por lo general corresponde al 72% de los lactobacilos totales y además se han encontrado otras especies como *L. cellobiosus*, *Lactobacillus* spp., *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *L. fermentum* (Steinkraus, 1995).

Kenkey. El *kenkey* es una masa cocida, de sabor ácido, y densa, que se sirve en trozos gruesos durante el desayuno en combinación con té, sardinas u otros alimentos. El maíz entero limpio se remoja por 2 días, durante este período los granos se suavizan lo cual es esencial para la siguiente operación que es la molienda húmeda. La sémola resultante se amasa hasta convertirse en una masa espesa, la cual se envuelve y fermenta a temperatura ambiente (25 a 30°C) por 2 a 4 días. Los microorganismos dominantes son lactobacilos heterofermentativos estrictos como *L. fermentum* y levaduras como *Candida krusei* y *S. cerevisiae*. Al terminar la fermentación la masa se divide en dos porciones iguales. Una porción se cuece con poco agua, se amasa continuamente con un palo de cocción hasta formar una pasta elástica gelatinizada denominada *aflata*, que se mezcla con la porción no cocida. La masa resultante se moldea a mano en unidades de 200 a 400 g y se envuelve en hojas de plátano (*Kenkey Fati*) u hojas de maíz (*Kenkey Ga*). Los empaques se cuecen por inmersión en agua hirviendo por pocas horas. La *aflata* posee una doble función: actúa como adhesivo, mantiene la forma, y retiene el agua necesaria para la gelatinización de la masa arenosa no cocida. Durante la fermentación se incrementa el nivel de lisina disponible (calidad proteica) y la biodisponibilidad nutritiva, además de formarse los compuestos del sabor (2,3-butanediol, ácido butanoico, ácido láctico, 3-metilbutanoico, ácido octanoico, 2-feniletanol, y ácido propanoico) (Nout *et al.*, 2007).

Tabla 2.4. Algunos alimentos fermentados tradicionales elaborados a base de maíz.

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

FSS Fermentación semisólida; SmF Fermentación sumergida; N Fermentación Natural

(Modificado de Nout *et al.*, 2007).

Mawe. El *mawe* es una masa de maíz fermentada popular en Benin y Togo. En contraste con el *kenkey* hecho de maíz entero, el *mawe* se elabora con maíz sin hollejo. Los principales criterios de calidad son el color, la finura y la acidez. En la fermentación están implicadas las bacterias lácticas y las levaduras. En el *mawe* se efectúa una fermentación natural por 1 a 3 días. El 90 % de las bacterias lácticas pertenecen al género *Lactobacillus* y 89% de ellos son *Lactobacillus reuteri* y *L. brevis*. Estos microorganismos producen ácido láctico y acético, dióxido de carbono y etanol a partir de hexosas por la vía de hexosas monofosfato contribuyendo al sabor del producto. También producen dióxido de carbono incrementando el volumen y porosidad del mismo. El pH del *mawe* se encuentra entre 3.9 y 4.2 dependiendo si se trata de un producto comercial o casero (Nout *et al.*, 2007).

Mahewu sudafricano (Mogou). El *mahewu* es una bebida tradicional ácido no alcohólica consumida por el pueblo Bantu de Sudáfrica. Se elabora por una fermentación espontánea tradicional en las aldeas a partir de

harina de maíz y agua. Esta mezcla se hierve hasta formar un atole y se agrega una pequeña cantidad de harina de trigo, la cual funciona como fuente de inóculo y factores de crecimiento para la fermentación espontánea. También se produce a gran escala por compañías industriales y pequeños productores para el consumo de sus trabajadores. Al momento del consumo, el *mahewu* contiene del 8 al 10% de sólidos y tiene un pH de aproximadamente 3.5 y una acidez titulable de 0.4 a 0.5% (ácido láctico). Se produce también en una forma concentrada o como un polvo seco para una mejor distribución y venta. El microorganismo predominante durante la fermentación espontánea es *Streptococcus lactis*, aunque se desarrollan otros microorganismos además de levaduras. Se han hecho fermentaciones con bacterias lácticas, y se ha observado que *L. delbrueckii* es el microorganismo más adecuado para la producción del ácido. Su valor nutricional es bajo pues el contenido proteico se incrementa del 7 al 9%. El contenido de tiamina generalmente disminuye durante el calentamiento y la fermentación. La riboflavina permanece sin cambios y la disponibilidad de niacina se duplica (Chelule *et al.*, 2010; Steinkraus, 1995).

2.8. MICROBIOTA NATURAL EN ALIMENTOS FERMENTADOS.

A pesar de los esfuerzos para controlar los patógenos transmitidos por alimentos, continúan presentándose los brotes originados por la ingesta de alimentos contaminados con éstos. La esterilización total del alimento no se realiza, pues causa que la mayoría de los componentes del alimento se modifiquen, y genera alimentos no aceptables o que pierden su valor nutricional. Es necesario entonces aceptar la presencia de la microbiota normal del mismo. Actualmente, los alimentos (incluyendo los alimentos fermentados), se estudian con un enfoque ecológico, de tal forma que además de buscar un microorganismo patógeno en particular, se evalúa la microbiota, y se ha descubierto que en muchos casos ésta es importante en el control de los microorganismos indeseables. Por lo que es fundamental entender las relaciones entre los diversos miembros del consorcio microbiano, con el objetivo de identificar los parámetros convenientes para controlar a la microbiota indeseable (Knorr y Wachter, 2010).

Para una manipulación efectiva en el desarrollo y actividades de los microorganismos en los alimentos fermentados, se deben considerar los siguientes tópicos (Giraffa, 2004; Fleet, 1999):

- Información en la diversidad, identidad taxonómica, fase de crecimiento, cambios cuantitativos, y distribución espacial de las especies microbianas que participan en la fermentación en cualquier etapa de la producción;
- Datos bioquímicos y fisiológicos en el proceso de colonización del alimento;

- Impacto en los factores intrínsecos, extrínsecos y de proceso que influyen el crecimiento microbiano, sobrevivencia y actividad bioquímica;
- Correlación entre el crecimiento y actividad de los microorganismos individuales en la inocuidad y calidad del producto.

En diversos alimentos fermentados la diversidad de microorganismos contribuye a las características organolépticas favorables y desfavorables del alimento. La interacción entre éstos origina diversos efectos que se mencionan a continuación:

En los alimentos fermentados tradicionales existe una población mixta de microorganismos como mohos, bacterias y levaduras. Los productos de fermentación en el alimento son resultado del metabolismo de éstos. Algunos de los compuestos formados durante la misma incluyen ácidos orgánicos (por ejemplo, ácidos palmítico, pirúvico, láctico, acético, propiónico y butírico), alcoholes (principalmente etanol), aldehídos y cetonas (acetaldehído, acetoína, 2-metilbutanol). Las bacterias que generan estos metabolitos no son patógenas para los consumidores y poseen enzimas como proteasas, amilasas y lipasas que hidrolizan las biomoléculas en la matriz de los alimentos. Los productos son no tóxicos y tienen texturas y aromas deseables que incrementan la palatabilidad para el consumo (Chelule *et al.*, 2010; Scott y Sullivan, 2008).

La fermentación láctica espontánea que se presenta en algunos alimentos fermentados tradicionales, es un proceso microbiano muy complejo durante el cual una pequeña población de bacterias lácticas se convierte en la microbiota dominante. El conocimiento de los eventos ecológicos que se presentan resulta esencial para el control de la misma. Factores como la concentración de los microorganismos, disponibilidad de nutrientes, velocidad de crecimiento de ciertas especies y las condiciones fisicoquímicas son indiscutiblemente importantes (Daeschel *et al.*, 1987).

La fermentación que se efectúa es la consecuencia de la microbiota láctica que eventualmente predomina de una gran variedad de microbiota que compone el sustrato original. Esta diversidad genera muchas interacciones microbianas, en donde la influencia en la actividad de ciertas bacterias lácticas en diferentes etapas, resulta de gran importancia en la calidad del producto. La clave para el éxito de la fermentación es mejorar la actividad de los microorganismos deseables, mientras que se suprime el crecimiento de los microorganismos patógenos o de descomposición (Daeschel *et al.*, 1987).

La cantidad y tipo de los ácidos que se generan durante la fermentación influencia la actividad microbiana subsecuente en el producto fermentado, así como el pH bajo y el tipo de ácido formado. Por ejemplo, el ácido acético tiene un efecto antagónico mayor contra los microorganismos en comparación con el ácido láctico. Estos efectos antagónicos se han documentado ampliamente en estos productos tradicionales fermentados. La generación de los metabolitos antagónicos (principalmente ácidos láctico y/o acético) son la base de la conservación del alimento. La producción de éstos, determina el tipo, número y secuencias de las poblaciones microbianas que se presentan en estas fermentaciones (Daeschel *et al.*, 1987).

En el *Attieke* y en el *Agbelima* (alimentos tradicionales fermentados de yuca africanos), se analizó la microbiota presente, se encontraron bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. brevis* (Chelule *et al.*, 2010). La presencia de éstos generó la acidificación del alimento debido a la generación de ácido láctico y ácido acético, lo cual provocó la disminución de microorganismos sensibles como *Bacillus circulans*, *B. lentus*, *Cronobacter sakasaki* (antes *Enterobacter sakasaki*), *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *Salmonella Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Shigella dysenteriae* y *E. coli* (Coulin *et al.*, 2006; Siaw *et al.*, 2003).

En alimentos fermentados de trigo, cebada y triticale (cereal híbrido de trigo y centeno creado artificialmente) humedecidos con residuos destilados de trigo, destinados para alimentación de lechones, se detectó la presencia de *L. plantarum*, *L. panis* y *Pediococcus pentosaceus* entre otros, con una acidificación de los cereales a pH 3.5-4.5 debido a la producción de ácido láctico y acético. Así mismo, se observó la disminución de las enterobacterias y mohos, que se presentó de manera más rápida en los sustratos inoculados que en los no inoculados, donde únicamente se desarrolló la microbiota natural de los cereales (Olstorpe *et al.*, 2010).

Se agregaron bacterias lácticas obtenidas de masa de maíz para pan ácido, en sustratos similares bajo condiciones controladas como inóculos individuales y en mezclas, entre los cuales se encontraban: *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *P. acidilactici*, *L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y la levadura *S. cerevisiae*. De igual forma que en los casos anteriores se observó la disminución en el pH hasta 4.5 y 3.0, lo que generó la inhibición en el desarrollo de *S. Typhi*, y *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus flavus*. La inhibición de *A. flavus* se presentó debido a la posible presencia de una bacteriocina generada por el cocultivo con *L. plantarum* y *L. brevis* (Edema y Sanni, 2008).

2.9. POZOL.

El *pozol* es una masa de maíz nixtamalizada fermentada en forma de bolas de varios tamaños y formas que incluso llegan a pesar hasta 1 kg (poco comunes) (Figura 2.7). Es consumido en poblaciones indígenas y mestizas del sureste de México como Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y en menor escala en Veracruz y Oaxaca. El *pozol* es similar a las masas de maíz fermentadas como el *koko* de Gana y *kenkey* y el *mahewu* sudafricano (Steinkraus, 1995).

Las bolas de *pozol* de reciente preparación o con varios grados de fermentación se diluyen con agua hasta obtener una bebida blancuzca que se consume como agua de tiempo o como alimento básico en estas comunidades. La relación *pozol*: agua es aproximadamente 1:2 o 1:3. A esta bebida se puede adicionar sal o chile molido tostado, azúcar, miel o cacao. Puede ser consumida durante el trabajo, el almuerzo, o como bebida



Figura 2.7. Pozol. Tipos de pozol encontrados en el mercado de San Cristóbal de las Casas, Chis.

A. Envuelto en hojas de plátano. **B.** Bolas de aproximadamente 1 Kg en bolsas de plástico. **C.** Elaborado de maíz blanco, maíz amarillo o maíz blanco con cacao. **D.** Elaborado de maíz azul o maíz blanco.

refrescante a cualquier hora del día, especialmente por personas de bajos recursos quienes lo consumen casi exclusivamente. Los Lacandones y Chamulas consumen bolas enmohecidas como provisión para sus jornadas en la selva. El consumo varía de 80 a 1000 g de *pozol* por persona al día (Steinkraus, 1995; Wachter *et al.*, 2000).

Así mismo, se le ha empleado durante varios siglos en ceremonias religiosas por la cultura maya antes de la conquista española. Continúa siendo consumido por muchos grupos étnicos como Chontales, Mayas, Lacandones, Tzetzales, Tzotziles, Tojolabales, Chamulas, Mames, Zoques y Zapotecos. Entre estos grupos los Lacandones lo emplean mezclado con agua y miel para disminuir la fiebre según sus costumbres. Los mayas actualmente lo ofrecen en ceremonias durante las distintas etapas del cultivo del maíz, cuando está inmaduro, maduro o listo para su cosecha día (Steinkraus, 1995; Wachter *et al.*, 2000).

También se le han dado usos medicinales, ya que se consume para el control de la diarrea. Se sabe que las bolas enmohecidas se han empleado como cataplasmas desde tiempos remotos para curar infecciones superficiales y heridas. Se han realizado estudios *in vitro* del efecto antagónico del *pozol* contra diversas especies de bacterias, levaduras y mohos, muchos de los cuales son patógenos o potencialmente patógenos para el hombre (Steinkraus, 1995; Wachter, *et al.*, 2000).

Etapas en la preparación.

El *pozol* se prepara domésticamente para consumo familiar o en pequeña escala comercial para venta en el mercado, de acuerdo a los procedimientos tradicionales empleados durante generaciones. En general, se elabora de la siguiente manera: el maíz preferiblemente blanco (*Zea mays L.*) se desgrana y aproximadamente 1 o 1 ½ kilogramos de este se hierva en una olla por 1 a 2 h en agua con cal para tener aproximadamente una concentración del 1 % de Ca(OH)_2 (P/V). Cuando los granos se hinchan y el pericarpio se desprende fácilmente, los granos se enfrían, enjuagan con agua y se drenan para obtener el llamado *nixtamal*. Éste se muele en un molino metálico manual o se lleva al molino comunitario, para obtener una masa que se moldea manualmente para obtener una bola. Las bolas se envuelven en hojas de plátano o bolsas de plástico para evitar la desecación y se fermentan a temperatura ambiente desde unas cuantas horas o incluso hasta 14 días dependiendo del gusto de los consumidores (Steinkraus, 1995; Wachter *et al.*, 2000).

Algunos componentes fibrosos no se solubilizan completamente durante la nixtamalización y se presenta un sedimento en la bebida cuando la masa se solubiliza en agua. Debido a que a la población mestiza (personas con

ancestros españoles) le desagrada este sedimento, se ha modificado aparentemente el procedimiento indígena hirviendo por segunda ocasión los granos de nixtamal en agua antes de la molienda, con lo cual se reduce el sedimento. En el estado de Tabasco, se agrega cacao molido a la masa antes de la fermentación, y se le denomina entonces *chorote* (Wacher *et al.*, 2000).

Se presentan dos cambios esenciales en la masa de maíz nixtamalizada durante la fermentación del *pozol*: el desarrollo del sabor ácido y un aroma característico que da al *pozol* sus propiedades refrescantes cuando se consume. El contenido de humedad permanece cercano al 30% (Steinkraus, 1995). Wacher *et al.* (2000), encontraron diferencias en la apariencia física de las bolas de *pozol* dependiendo del proceso de elaboración. En el *pozol* mestizo era más suave y húmeda en comparación con el producto indígena, que tiene un aspecto más seco y con partículas duras. El contenido de agua en el primero fue de 72% y en el segundo fue de 52% (P/P), debido presumiblemente a una mayor absorción de agua en la masa mestiza debido a la cocción adicional de los granos de maíz nixtamalizados. La cocción adicional que se aplica en el proceso mestizo tiene un efecto principal sobre las propiedades físicas de la masa, y se presenta un efecto mínimo en la microbiología de la fermentación.

Otra característica importante es el incremento en el contenido nutritivo. El *pozol* contiene valores mas altos en la concentración de proteína (donde las especies fijadoras de nitrógeno pueden ser las responsables del incremento en el nitrógeno total presente en el producto fermentado), niacina, riboflavina, lisina, triptófano en comparación con el maíz del cual se elabora, aunque este último contiene mayor concentración de tiamina y fósforo. Además se encontró una mejor calidad proteica en el *pozol* medida por la composición de aminoácidos esenciales y la eficiencia proteica en el desarrollo de ratas albinas, además de haberse encontrado un mayor contenido de nitrógeno total en el alimento fermentado (Steinkraus, 1995).

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

3.1. MICROBIOLOGÍA DEL *POZOL*.

Entre las bacterias aisladas del *pozol* se encuentran *Agrobacterium azotophilum*, *B. cereus*, *Paracolobactrum aerogenoides*, y *Achromobacter pozolis*, el primero de ellos es un fijador de nitrógeno que contribuye al incremento en el contenido de nitrógeno en el *pozol* (Taboada *et al.*, 1975; Ulloa y Herrera, 1972). También se ha reportado la presencia de *Pseudomonas mexicana* y *K. pneumoniae*, en algunas muestras ésta última fue la responsable de la fijación de nitrógeno (Steinkraus, 1995; Salinas y Herrera, 1974). Dentro de las enterobacterias aisladas se han identificado *E. coli* var. *neapolitana*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans* y *E. coli* (Sainz *et al.*, 2001; Steinkraus, 1995; Wachter, 1995; Salinas y Herrera, 1974).

No se han encontrado diferencias significativas en la microbiota de bacterias lácticas presente en el *pozol* indígena y mestizo. En el primero se han encontrado bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*; en cambio en el *pozol* mestizo se han encontrado *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y no se han encontrado *Pediococcus* (Wacher *et al.*, 2000). En ambos tipos de *pozol* se encontraron también bacterias mesófilas aerobias no lácticas con características por lo general Gram-positivas, catalasa-positivas y esporuladas, que corresponderían al género *Bacillus* (Wacher, 1995).

Dentro de los hongos que se han encontrado frecuentemente a partir de las primeras horas de fermentación están *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y *Candida*. Mohos como *Cladosporium cladosporoides* o *C. herbarum*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus* son también comunes en las bolas de *pozol* cuando la superficie se seca paulatinamente y el pH disminuye. Otras de las especies de mohos aislados del *pozol* son: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces fumosoroseus*, *Rhizopus stolonifer*, *T. viride*, *T. reesei*; *Penicillium claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. lanoso-viride* y *Phialophora richardsiae* (Steinkraus, 1995; Ulloa, 1974).

Con respecto a las levaduras se encontraron en el *pozol* indígena *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*; en el *pozol* mestizo no se detectaron *R. minuta* ni *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*. En cuanto a los mohos se encontraron *Cladosporium cladosporoides*, *Phoma glomerata*, *P. fimeti*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium fellutanum*; en el *pozol* mestizo únicamente no se encontró *P. fimeti* (Wacher *et al.*, 2000). En un estudio previo se identificó también *C. krusei*, *Trichosporon*

cutaneum y *Hansenula fabianii*, *Kluyveromyces fragilis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *S. cerevisiae* (Steinkraus, 1995; Ulloa, 1974).

También se ha analizado la microbiota presente durante la fermentación del *pozol* y se utilizaron técnicas independientes del cultivo. Ampe *et al.* (1999), realizaron la hibridación cuantitativa del RNA total de una muestra de *pozol* de Villahermosa, Tabasco y emplearon sondas género y dominio-específicas. Los autores encontraron que al inicio de la fermentación los géneros dominantes fueron *Leuconostoc* y *Lactococcus*. Al final de la misma el género dominante fue *Lactobacillus*. Además, se observó hibridación con las sondas para enterobacterias en la muestra analizada, aunque solo en un 0.3% en relación al RNA total del alimento.

Con una aproximación polifásica a partir de muestras de *pozol* del estado de Villahermosa, Tabasco, Ampe *et al.* (1999), encontraron por hibridación con sondas de RNA que el género *Leuconostoc* aportó el 7% del total de la microbiota en la periferia de la bola de *pozol* y 3 al 4% dentro de la misma. No se detectaron miembros del género *Lactococcus* en la periferia pero dentro de la bola era un 1.5%. El grupo formado por *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weisella* aportó un 60% de la microbiota activa tanto en la periferia como en el centro de la bola de *pozol*. Por último, predominó el género *Pediococcus*, y se observó el incremento en los géneros *Streptococcus* y algunos *Leuconostoc* spp. Estos últimos tres géneros se encontraron en un 27% en la periferia y en el centro en un 54%. Las enterobacterias mediante esta aproximación solo se encontraron en la periferia de la bola. Los mohos y levaduras se encontraron en la periferia en un 6% y en un 2% en el centro de la bola. En el mismo estudio realizando un análisis por DGGE de amplicones del DNAr 16S se encontraron *Acetobacter aceti*, *Bacillus subtilis*, *L. casei*, *Streptococcus bovis*, miembros de los grupos *Weisella-Leuconostoc*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. pentosus*.

Al amplificar el DNAr 16S y analizar los amplicones por electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE), Ampe *et al.* (2000), encontraron que *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* y *L. delbrueckii* fueron los microorganismos comúnmente encontrados en las bolas de *pozol* de Villahermosa, Tabasco. Estos microorganismos también están presentes en alimentos fermentados africanos como el *Ogi* y el *Poto-Poto*, aunque en el *pozol* son más abundantes, posiblemente debido a las condiciones de pH neutras del maíz nixtamalizado antes de la fermentación.

La dinámica de la microbiota durante la fermentación se monitoreó con un enfoque polifásico, y se encontró que las especies del género *Streptococcus* aportaron del 25 al 75% de la microbiota total durante el proceso. La

microbiota aeróbica epifítica inicial fue reemplazada en los primeros 2 días por bacterias lácticas heterofermentativas, incluidos *L. fermentum* y fue progresivamente sustituida por bacterias lácticas homofermentativas (estrechamente relacionadas a *L. plantarum*, *L. casei* y *L. delbrueckii*) quienes continuaron con la acidificación de la masa. Al mismo tiempo una vasta comunidad de mohos y levaduras se desarrollaron principalmente en la periferia de la masa. La presencia de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y enterobacterias indicó que algunos microorganismos importantes en el *pozol* tienen origen fecal (Ben Omar *et al.*, 2000).

A partir de una muestra de *pozol* de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, se realizó la clonación de amplicones del DNAr 16S de microorganismos Gram-positivos. De estas clonas se encontraron 14 clonas únicas y fueron identificadas como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. alimentarium*, *L. delbrueckii* y *Clostridium* sp. (Escalante *et al.*, 2001).

Al amplificar fragmentos de 400 pb del gen *rpoB* y analizar por DGGE la diversidad de bacterias lácticas en distintos productores del *pozol* de Villahermosa, Tab., durante 0, 24, 48 y 72 h de fermentación, se encontró que *Streptococcus infantarius*, *W. confusa* y *L. lactis* se encuentran presentes durante todo el proceso, mientras que *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* aparecieron a partir de las 48 h (López, 2006).

Se ha determinado la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del *pozol* de Villahermosa; Tab. Se encontró que cepas de los géneros *Streptococcus* sp., *Weisella paramesenteroides* y *Leuconostoc paramesenteroides* tienen esta característica al ser evaluada su resistencia al fenol, producción de peróxido de hidrógeno, sobrevivencia al pH 2.5 a 3.0, resistencia a las sales biliares, resistencia a antibióticos así como la capacidad de adherencia a células Hep-2 (Rodríguez y Villalva, 2010).

Así mismo a partir del *pozol* de Villahermosa, Tab., se detectó *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en una concentración entre 10^4 a 10^5 UFC/g en masas recién elaboradas, con 48 h y después de una semana de fermentación, lo cual indicó que su consumo podría ser fuente de intoxicaciones alimentarias (Morales, 2011).

Dinámica de la fermentación.

La mayoría de los microorganismos presentes en los granos de maíz se destruyen con el tratamiento térmico en álcali para obtener el nixtamal. Estudios realizados en condiciones controladas sobre la microbiología del *pozol* de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, mostraron que la mayoría de los grupos microbianos estudiados después

del tratamiento de los granos de maíz con cal, permanecen en niveles menores de 10^1 UFC/g para las bacterias lácticas y enterobacterias; y en niveles menores de 10^2 UFC/g para las bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras. Después de la molienda del nixtamal, estos niveles se incrementaron a 10^6 UFC/g para las bacterias lácticas, a 10^5 UFC/g para las bacterias mesófilas aerobias, a 10^3 UFC/g para las enterobacterias, a 10^4 UFC/g para los mohos y 10^3 UFC/g para las levaduras. Debido a que la elaboración del *pozol* se realiza sin medidas higiénicas, durante el procesamiento del nixtamal ocurre una inoculación de la masa, cuyos orígenes son variados aunque existen varias especies de mohos y levaduras que se desarrollan sin importar la región donde se elabora (Wacher, 1995; Steinkraus, 1995).

Al inicio de la fermentación (pH 7.3), en el *pozol* tradicional, se tiene un contenido de bacterias lácticas (10^4 a 10^6 UFC/g), mesófilos aerobios (10^4 a 10^5 UFC/g), enterobacterias (10^2 a 10^3 UFC/g), levaduras (10^2 a 10^4 UFC/g) y mohos (menos de 10^3 UFC/g) y después de 30 h de fermentación a 28°C (pH 4.6), se alcanzan niveles de 10×10^9 UFC/g de bacterias lácticas, 7×10^6 UFC/g de mesófilos aerobios, 5×10^5 UFC/g de enterobacterias, 1×10^6 UFC/g de levaduras y 10^4 UFC/g de mohos (Steinkraus, 1995).

La fermentación del *pozol* inicia con una microbiota mixta y durante las primeras 12 horas crece la mayoría de las bacterias presentes en la masa. Las bacterias lácticas inician con números grandes (10^5 UFC/g) y semejantes a los de las bacterias no lácticas. La microbiota predominante inicial que se desarrolla en el *pozol* son las LAB y las grandes concentraciones iniciales de éstas, se debe a la contaminación que ocurre durante la molienda (Nuraida *et al.*, 1995; Wacher, 1995). El pH de la masa al inicio de la fermentación es cercano a 7.0 y a las 24 h las LAB, se desarrollan hasta 10^9 UFC/g, y el pH de las masas ha alcanzado valores inferiores a 4.5. En general, el crecimiento de bacterias lácticas en el *pozol* es semejante o más rápido que en otros alimentos similares (Wacher, 1995). En consecuencia, la fermentación del *pozol* al inicio es una fermentación láctica (Nuraida *et al.*, 1995). La mayoría de las fermentaciones lácticas naturales inicia con una microbiota muy variada que incluye números muy pequeños de bacterias lácticas, las cuales después de un tiempo de fermentación predominan sobre todas las demás, y en muchas ocasiones son las únicas presentes en el alimento fermentado final (Wacher, 1995).

El crecimiento de los diferentes grupos microbianos en el *pozol* indígena y mestizo de San Cristóbal de las Casas, Chiapas es similar, aunque el valor de pH declina más rápido en el *pozol* indígena que en el *pozol* mestizo, debido a una mayor concentración de carbohidratos fermentables. Al cuantificar los grupos microbianos tanto

en la periferia como en el interior de las bolas Wachter *et al.* (2000), no encontraron diferencias en los números de LAB y enterobacterias, aunque las levaduras y mohos crecieron entre 250 y 800 veces más en la superficie que en el interior de las muestras de bolas de *pozol*. Estudios posteriores sobre la microbiota durante la fermentación mostraron el mismo comportamiento, Ampe *et al.* (1999), encontraron en el *pozol* de Villahermosa, Tabasco que los grupos microbianos se desarrollaron en números similares y que el desarrollo microbiano se acompañó con un decremento en el pH. Esta disminución se presentó más rápido en el centro de la bola de *pozol* que en la periferia, el pH final a las 72 h en el centro fue de 3.8 mientras que en la periferia fue arriba de 4.0.

En otros alimentos fermentados en los que los números iniciales de bacterias lácticas son iguales o menores a los del *pozol*, las LAB predominan sobre las demás. En general, el crecimiento de bacterias lácticas en el *pozol* es semejante o más rápido que en otros alimentos similares. Con respecto al pH en estos últimos, se obtienen valores similares a los que se observaron en masas de nixtamal con el mismo tiempo de fermentación (12 o 24 horas). El pH del *ogi* de Nigeria puede disminuir hasta 3.5, pero la acidez correspondiente a éste ya no es aceptable, por lo que el pH mínimo debe ser 3.7 (Wachter, 1995; Steinkraus, 1995). En el caso del *gari* de Nigeria se obtiene el sabor deseado con un pH de 4.0 (Wachter, 1995). Para el *mahewu* utilizando cultivos de LAB y debido a una baja capacidad amortiguadora del sustrato, el pH baja rápidamente siendo a las 24 horas de 3.5 a 3.7 (Simango y Rukure, 1992; Steinkraus, 1995; Gadaga *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existe un interés en el consumo de alimentos fermentados tradicionales y se piensa que los patógenos bacterianos que causan enfermedades transmitidas por alimentos como las diarreas, no pueden sobrevivir por largos periodos debido a que durante la fermentación se producen ácidos orgánicos generados por LAB como el lactato, propionato y acetato que pueden ser inhibitorios.

Se ha reportado la sobrevivencia de bacterias patógenas en números de 10^6 UFC/g en el *mahewu* y en papillas ácidas con un pH después de la fermentación de 2.74 y 2.91 en cada caso (0.5% y 0.44% de ácido láctico respectivamente). En cambio microorganismos como *Aeromonas* y *Campylobacter* no sobrevivieron después de 10 min. Así mismo, *Salmonella* sp. no se detectó después de 4 horas a partir de la inoculación. En el *mahewu* ni *Shigella*, ni *E. coli* enterotoxigénica sobrevivieron después de 24 h y se presentó la sobrevivencia de *E. coli* enteropatogénica después de 24 h, aunque los números disminuyeron a 10^3 UFC/g. En papillas ácidas de maíz fermentadas se observaron los mismos resultados para *Aeromonas*, *Campylobacter* y *Salmonella*; sin embargo, después de 24 h se observó una disminución a 10^3 UFC/g de *Shigella* y los dos patotipos de *E. coli* empleados (Simango y Rukure, 1992).

En el *kenkey* se observó un desarrollo de las LAB durante la fermentación de 10^6 UFC/g a 10^9 UFC/g, en cambio los microorganismos catalasa positivos reducen su número de 10^6 UFC/g y los hongos de 10^5 UFC/g después de 24 h de fermentación no se detectan ($<10^2$ UFC/g). El pH disminuye de 6.0 a 3.7 en el mismo lapso de tiempo (Halm *et al.*, 1993). Olsen *et al.* (1995), estudiaron el efecto antimicrobiano de LAB como *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. fermentum/reuteri* y *L. brevis*, aisladas de este alimento fermentado africano encontraron que tuvieron efecto antimicrobiano contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos como *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, además de *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *M. luteus* y *Staphylococcus carnosus*, se encontró que el pH disminuyó de 6.5 a 3.8 a 4.5 debido a la producción de ácido láctico principalmente en concentración de 1.5 a 2.5 g/L, además se detectaron otros compuestos antimicrobianos resistentes a enzimas proteolíticas.

Como se mencionó previamente, en el *pozol* se han encontrado bacterias lácticas, tanto homofermentativas como heterofermentativas, entre los géneros detectados por diversas aproximaciones están *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weisella*. Así mismo, se caracteriza su desarrollo por la producción de ácidos orgánicos, las masas fermentadas se acidifican alcanzando valores de pH bajos a las 12 horas de

fermentación. En general, el crecimiento de bacterias lácticas en el *pozol* es semejante o más rápido que en otros alimentos similares. Sin embargo, éstas no tienden a predominar, ya que los otros grupos bacterianos (mesófilos no lácticos y enterobacterias) no desaparecen después de 9 días de fermentación.

En el *pozol* también se ha estudiado el efecto antimicrobiano de algunos microorganismos aislados en él. La bacteria *A. azotophilum* presentó diversos grados de actividad antagonista in vitro en contra de *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *G. candidum*, *Monilia sitophila*, *P. claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. lanoso-viride*, *Rhizopus stolonifer* y *T. reesei* (Steinkraus, 1995; Herrera y Ulloa, 1975). Estudios posteriores identificaron a *A. azotophilum* como *Bacillus* sp. cepa CS93, los compuestos antimicrobianos de carácter proteico que produce son iturina, bacilisina y clorotetaína. La iturina mostró actividad antimicrobiana contra bacterias, mohos y levaduras, se comprobó que posee actividad antimicrobiana contra *E. coli*. La bacilisina y clorotetaína presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Absidia* sp. (Trevor et al., 2004).

En contraste con la mayoría de los reportes en los que se observa una inhibición o eliminación eficiente de microorganismos indeseables en alimentos fermentados acidificados, el grupo de las enterobacterias, que puede incluir patógenos causantes de enfermedades diarreicas, no se inhibe durante la fermentación, a pesar de la disminución del pH de las masas. Las enterobacterias crecen en el *pozol* tanto superficialmente como en el interior de las masas durante las primeras 9 horas de fermentación alcanzando números de 10^5 a 10^6 UFC/g, a pesar de la disminución en el pH (4.5) se mantienen hasta las 48 horas. Inclusive a los 9 días de fermentación aún se encuentran niveles de 10^4 UFC/g en el *pozol* mestizo y 10 UFC/g en el *pozol* indígena (Wacher et al., 2000; Wacher, 1995; Cañas, 1993).

Con un enfoque polifásico, al enumerar las enterobacterias en el *pozol* de Villahermosa, Tabasco, Ben Omar et al. (2000), encontraron la misma tendencia en este grupo de microorganismos. Al inicio se encuentran en números de 10^5 UFC/g y se desarrollaron en la periferia a 10^8 UFC/g y disminuyeron a 10^4 UFC/g en el interior. En el mismo estudio se emplearon sondas filogenéticas de RNAr para cuantificar distintos grupos microbianos y se encontró que las enterobacterias a las 48 h de fermentación correspondieron al 6 y 2% del RNAr total cuantificado en la periferia e interior respectivamente. A las 96 h y para ambas zonas, con la misma aproximación los números de enterobacterias aportaron el 2% del RNAr total cuantificado. Después de 96 h de fermentación el pH había disminuído a 5.5 en la superficie y a 3.8 en el interior, y la producción de ácido láctico se incrementó a 200 $\mu\text{mol/g}$ y 150 $\mu\text{mol/g}$ respectivamente.

Sainz *et al.* (2001), cuantificaron enterobacterias y aislaron cepas de *E. coli* a partir del *pozol* de Villahermosa, Tabasco después de 6 h y 48 h de fermentación. Las enterobacterias desarrollaron a las 6 h entre $10^{4.2}$ UFC/g y $10^{7.8}$ UFC/g en este tiempo y el pH había disminuído a 3.7 y 4.7. Algunas de las cepas fueron recuperadas de la muestra de 48 h cuando el pH disminuyó entre 4.7 y 3.7. Entre los patotipos encontrados se identificaron *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* uropatógena. Lo cual indica que este alimento ácido fermentado tradicional podría ser una fuente potencial de enfermedades diarreicas.

Dado que los diferentes estudios realizados en el *pozol* han reportado la presencia de enterobacterias a lo largo de la fermentación láctica y así como el haber aislado microorganismos patógenos cuando el alimento ya presentaba condiciones ácidas, surge la inquietud de explorar cuáles son los factores que originan la prevalencia de este grupo microbiano. El poder elucidar estos factores ayudaría al control microbiológico para asegurar la inocuidad de este alimento fermentado tradicional sin que pierda las características sensoriales e inclusive medicinales que favorecen su consumo tradicional en el Sureste mexicano.

CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

5.1. HIPÓTESIS.

En el *pozol* se desarrolla una fermentación natural debido a la microbiota presente en el sustrato y a la microbiota incorporada durante el proceso de elaboración. Ya que en él se efectúa de manera espontánea una fermentación láctica debida a las bacterias lácticas y además se desarrollan otros grupos microbianos entre los que se encuentran las enterobacterias, resulta interesante que a pesar de generarse condiciones y/o metabolitos no favorables para la permanencia de las enterobacterias, estas persistan en el alimento.

Al utilizar masa de harina de maíz nixtamalizado inoculadas con una enterobacteria y una bacteria láctica, para simular las condiciones de fermentación del *pozol*, la microbiota naturalmente asociada a la masa tiene un efecto protector en las enterobacterias contra el efecto de la acidez producida por las bacterias lácticas. Así mismo la permanencia de este grupo es el resultado de la adaptación natural a estas condiciones ambientales.

5.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores que influyen en la concentración de enterobacterias durante la fermentación de masas de harina de maíz nixtamalizado.

5.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Evaluar el efecto de la microbiota natural en la concentración de enterobacterias durante la fermentación de masas de harina de maíz nixtamalizado.

- ✓ Evaluar el efecto antimicrobiano de una bacteria láctica inoculada en la concentración de enterobacterias durante la fermentación de masas de harina de maíz nixtamalizado.

- ✓ Comparar el efecto del ácido láctico generado durante la fermentación en los sustratos de harina de nixtamal en la concentración de enterobacterias.

- ✓ Determinar la concentración de enterobacterias aisladas del alimento fermentado y/o aisladas de fuentes distintas frente al ácido láctico generado durante la fermentación de suspensiones de harina de maíz nixtamalizado.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sustratos

Los sustratos utilizados en las fermentaciones fueron preparados con harina de maíz nixtamalizado comercial (MASECA; Chalco, Edo. México).

6.1.1. Masas de harina de maíz nixtamalizado.

Se trabajo con un modelo experimental para simular las condiciones en las que se efectúa la fermentación del *pozol* bajo condiciones controladas, por lo cual se realizaron masas de harina de maíz nixtamalizado con una concentración de sólidos similar a la que se ha reportado en el *pozol* (46% P/V).

6.1.1.1. Masas de harina de maíz nixtamalizado sin esterilizar.

Se pesaron 125 g de harina en bolsas de plástico estériles *Stomacher* (Seward-400). Se adicionaron 146 mL de agua destilada no estéril (para las masas no inoculadas), o 96 mL del mismo diluyente (para las masas inoculadas), y los inóculos respectivos descritos en las secciones 6.4.1 y 6.4.2. de este capítulo. Se amasó manualmente por el exterior de la bolsa hasta formar una masa homogénea. La concentración final de sólidos en la masa después de la inoculación de los microorganismos de estudio para cada fermentación fue de 46% (P/V).

6.1.1.2. Masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas.

Se pesaron 125 g de harina de maíz nixtamalizado y se colocaron en bolsas de plástico estériles *Stomacher* (Seward 400), se procedió a sellar por calor. La harina empacada se esterilizó por radiación Gamma (2.5 Mrad, Fuente Co⁶⁰) en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM. Para corroborar la ausencia de microorganismos en la

harina esterilizada se realizó una prueba de esterilidad como se describe a continuación. Dicha prueba se efectuó antes de elaborar las masas.

El tratamiento para la preparación de la masa estéril fue similar al descrito para el caso de la masa no inoculada, aunque para mantener las condiciones de esterilidad de la masa, durante la preparación se empleó agua destilada estéril.

Prueba de esterilidad. Se realizó a la harina de nixtamal esterilizada, a partir de una dilución decimal de la muestra en agua peptonada estéril al 0.1% (P/V) (Oxoid), se inoculó 0.1 mL en una caja de Petri con agar para cuenta en placa por extensión superficial, incubando a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Incubadora VWR-1550) durante 24 h. Al término de la incubación no se observó crecimiento de microorganismos, lo que corroboró la esterilidad.

6.1.2. Suspensiones esterilizadas de harina de maíz nixtamalizado.

Se emplearon suspensiones de harina de maíz nixtamalizado en las fermentaciones donde se evaluó el efecto del ácido láctico generado durante la fermentación láctica, para evitar los fenómenos de transferencia de masa asociados a la difusión del ácido láctico en sustratos sólidos (masas de harina de maíz nixtamalizado).

Se pesaron 25 g de harina de maíz nixtamalizado en bolsas de plástico y se sellaron por calor. Se esterilizaron por radiación Gamma (2.5 Mrad, Fuente Co^{60}) en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM. Al sustrato esterilizado se le realizó la prueba de esterilidad descrito en el inciso 6.1.1.2. Para preparar la suspensión se adicionó el sustrato esterilizado en un matraz Erlenmeyer 250 mL con 80 mL de agua destilada estéril para las suspensiones inoculadas con *L. plantarum* y enterobacterias, o con 90 mL del mismo diluyente para las suspensiones inoculadas únicamente con enterobacterias. Finalmente, se agregaron el o los inóculos respectivos para cada caso (sección 6.4.1 y 6.4.2). La suspensión inoculada se agitó para homogenizar los inóculos. La concentración final de sólidos en las suspensiones inoculadas fue de 20% (P/V).

6.2. Microorganismos.

6.2.1. Bacteria láctica.

La bacteria láctica utilizada en las fermentaciones fue *Lactobacillus plantarum* (Pz-9) tomada de la colección de bacterias lácticas aisladas de *pozol* de San Cristobal de las Casas, Chis (Nuraida *et al.*, 1995). Se eligió esta bacteria láctica debido a que se ha detectado constantemente como parte de la microbiota láctica presente en este alimento, así como en otros alimentos fermentados tradicionales a base de maíz como el *ogi* y el *mahewu*. Se realizó una tinción de Gram y la prueba de la catalasa para corroborar su pureza, se verificó el carácter Gram-positivo, uniformidad en tamaño de los bacilos observados y el carácter catalasa-negativo de los microorganismos pertenecientes a este género.

6.2.2. Enterobacterias.

6.2.2.1. *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028).

Fue donada por el cepario de la Facultad de Química, UNAM. Se corroboró la especie de la cepa con el sistema API 20E (BioMérieux), se obtuvo una muy buena identificación, con un 97% de similitud con la base de datos del sistema APIWeb de BioMérieux® (V: 1.1.0; 2003). La técnica para la identificación de la cepa por el sistema API 20E se describe en el Anexo I. Se corroboró su pureza mediante una tinción de Gram, y se verificó el carácter Gram-negativo, y la uniformidad en tamaño de los bacilos esperados. Se eligió esta enterobacteria ya que se ha empleado frecuentemente como modelo en estudios de laboratorio.

6.2.2.2. *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso diarreico.

Fue donada por el Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”, se detectó como única enterobacteria en un paciente menor de 3 años con un cuadro diarreico. Para corroborar su pureza se realizó tinción de Gram, se verificó el carácter Gram-negativo y uniformidad en los bacilos observados.

6.2.2.3. *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol.

Klebsiella pneumoniae es una de las enterobacterias que se ha aislado frecuentemente en trabajos previos donde se describe la microbiología de este alimento, por lo cual se decidió utilizarla en este estudio. Se aisló de pozol originario de Villahermosa, Tab., e identificó la especie con el sistema API 20E (Biomériux), se obtuvo una muy buena identificación, con un 97.8% de similitud con la base de datos del sistema APIWeb de BioMérieux® (V: 1.1.0; 2003). Para corroborar su pureza antes de la inoculación se realizó una tinción de Gram, se verificó el carácter Gram-negativo, y la uniformidad de los bacilos observados. Para tener una enterobacteria de origen distinto a la de este alimento se empleó una cepa aislada de un caso de diarrea infantil, la cual se describió en el inciso 6.2.2.2.

6.3. Conservación de las cepas.

Los microorganismos utilizados en el estudio fueron conservados por dos técnicas:

- a) Subcultivo en agar. Se empleó para mantener viable la cepa por períodos de tiempo cortos (2 a 3 meses). Para conservar la bacteria láctica empleada, se tomó una asada de la colonia del microorganismo desarrollada en agar APT (Oxoid) y se inoculó por punción con asa microbiológica estéril recta en viales con medio APT semisólido (caldo APT (Oxoid), adicionada de 0.3% de agar bacteriológico (Oxoid)) y carbonato de calcio para neutralizar los ácidos generados durante el período de conservación. Se incubó a 30°C durante 18-24 h y se almacenó en refrigeración (5°C).

En el caso de las enterobacterias, se tomó una colonia aislada del microorganismo desarrollado en agar bilis rojo violeta y se inoculó por estría en viales con agar soya tripticaseína (Oxoid) inclinado. Se incubó a 37°C durante 18 a 24 h y se almacenó en refrigeración (5°C).

- b) Congelación en perlas de vidrio a -70°C utilizada para mantener viables las cepas por períodos de tiempo mayores (mayor a 6 meses). Para conservar la bacteria láctica se inoculó una colonia aislada en tubos con 10 mL caldo APT (Oxoid); en el caso de las enterobacterias se inoculó la colonia en 10 mL de caldo soya tripticaseína. Se incubaron a 30°C durante 24 a 48 h. Se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 15 min y se

eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, se centrifugó después de cada lavado bajo las mismas condiciones. Por último, la bacteria láctica se resuspendió en caldo APT estéril y la enterobacteria en caldo soya tripticaseína estéril, se tomaron 2.0 mL de cada suspensión y se adicionó a crioviales con perlas de porcelana y glicerol al 15% como agente crioprotector. Se agitaron los viales y se eliminó el exceso de líquido de tal forma que únicamente quedaran la suspensión bacteriana dentro de los orificios de las perlas. Los viales así preparados se almacenaron en ultracongelación a -70°C.

6.4. Preparación de los inóculos.

6.4.1. Bacteria láctica.

Se tomó una asada del cultivo conservado en medio APT-semisólido y resuspendió en 10 mL de caldo APT estéril. Se incubó a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Se tomó 0.1 mL de este cultivo y se inoculó en un tubo de centrifuga conteniendo 10 mL del mismo medio e incubó a las condiciones ya descritas. Al término de la incubación se centrifugó a 5,000 r.p.m. (centrífuga Beckman J2-21M) durante 15 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células. El paquete celular se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril y centrifugó bajo las mismas condiciones cada vez. El paquete celular limpio se diluyó en 10 mL de agua destilada y se realizaron diluciones decimales hasta tener una concentración aproximada de 10^7 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias en un mililitro o gramo). A partir del inóculo estandarizado se adicionaron 25 mL en la harina para preparar las masas, ó 10 mL en la harina para preparar las suspensiones.

6.4.2. Enterobacterias.

Se tomó una asada del cultivo conservado en agar soya tripticaseína y resuspendió en 10 mL de caldo soya tripticaseína estéril. Se incubó a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Se tomó 0.1 mL de este cultivo e inoculó en un tubo de centrifuga con 10 mL del mismo medio e incubó a las mismas condiciones. El inóculo se lavó con agua destilada con el procedimiento descrito en la sección 6.4.1., se diluyó hasta tener una concentración aproximada de 10^5 UFC/mL o g de suspensión o masa. A partir del inóculo estandarizado se adicionaron 25 mL en la harina para preparar las masas, o 10 mL en la harina para preparar las suspensiones.

6.5. Fermentaciones.

Para cumplir con el primero objetivo del estudio, se evaluó el efecto que tiene la microbiota natural del sustrato en la permanencia de enterobacterias y se trabajó con masas sin esterilizar. Por una parte, estas masas no se inocularon con microorganismo alguno, para observar como se comportarían las bacterias lácticas y las enterobacterias naturalmente contenidas en las masas no esterilizadas. En segundo lugar, en masas sin esterilizar (para permitir el desarrollo de la microbiota natural del sustrato), se inoculó una enterobacteria representativa de su género (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) además se inoculó una bacteria láctica aislada del *pozol*. Finalmente, se comparó la permanencia de la enterobacteria al erradicar la microbiota natural del sustrato. Para observarlo, la bacteria láctica y la enterobacteria se inocularon en masas esterilizadas previamente.

Para cumplir con el segundo objetivo del estudio se emplearon masas de harina de maíz nixtamalizado comercial esterilizadas y se inocularon con la bacteria láctica aislada del *pozol*. Además de ésta, se inocularon por separado una enterobacteria aislada del mismo alimento (*Klebsiella pneumoniae*), o una enterobacteria del mismo género y especie, pero de hábitat u origen distinto al de este alimento, y se comparó la concentración de las enterobacterias en cada fermentación.

Por último, se ponderó la permanencia de las enterobacterias en función de la concentración del ácido láctico que se genera durante la fermentación. Esto se efectuó en suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas, e inoculadas por separado con cada una de las enterobacterias empleadas en este trabajo. A cada suspensión inoculada, se le adicionó la concentración de ácido láctico equivalente a la que se generó en una fermentación inoculada además con la bacteria láctica y se comparó la concentración de enterobacterias en cada una.

Se describe a continuación como se prepararon las fermentaciones con los sustratos esterilizados y los inóculos que se adicionaron.

6.5.1. Fermentaciones de masas de harina de nixtamal.

La metodología general seguida en las fermentaciones de masas, se describe en la Figura 6.1.

- ✓ Las masas de harina de maíz nixtamalizado fueron preparadas con la metodología descrita en la sección 6.1.1 (masas elaboradas con harina de maíz nixtamalizado sin esterilizar, sección 6.1.1.1 y masas elaboradas con harina de maíz nixtamalizado esterilizadas, sección 6.1.1.2, respectivamente).
- ✓ Los microorganismos inoculados en cada fermentación se prepararon con la técnica descrita en la sección 6.4.
- ✓ Se distribuyeron 75 g de la masa inoculada en frascos de vidrio estériles de 100 g de capacidad.
- ✓ Los frascos se taparon y se incubaron en todos los casos a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 96 h.
- ✓ Cada fermentación se realizó por triplicado.

Se enlistan a continuación las diferentes fermentaciones realizadas en masas.

1. Fermentación de masas no esterilizadas sin inocular (Figura 6.1, bloque ①).
2. Fermentación de masas no esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* (Figura 6.1, bloque ②).
3. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* (Figura 6.1, bloque ③).
4. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *K.pneumoniae* aislada del *pozol* (Figura 6.1, bloque ④).
5. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *K.pneumoniae* aislada de un caso diarreico (Figura 6.1, bloque ⑤).

6.5.2. Fermentaciones de suspensiones de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas.

La metodología general seguida para las fermentaciones realizadas en suspensiones se describe en la Figura 6.2.

- ✓ Las suspensiones de harina de maíz nixtamalizado se prepararon con la metodología descrita en la sección 6.1.2.

- ✓ Los inóculos se prepararon con la técnica descrita en la sección 6.4.
- ✓ Los matraces se incubaron en todos los casos a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ a 100 r.p.m. durante 96 horas en una agitadora orbital (Thermolyne-Biggerball). La agitación se realizó para mantener homogéneo el sistema.
- ✓ Cada fermentación se realizó por triplicado.

Se enlistan a continuación las diferentes fermentaciones realizadas en las suspensiones, así como la metodología seguida en las fermentaciones donde se adicionó ácido láctico.

1. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas e inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* (Figura 6.2, bloque ①).
2. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas e inoculadas con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del *pozol* (Figura 6.2, bloque ②).
3. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas e inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del *pozol* (Figura 6.2, bloque ③).
4. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del *pozol* con adición externa de ácido láctico (Figura 6.2, bloque ④).
5. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas (100 r.p.m.), inoculadas con *K. pneumoniae* aislada de un caso diarreico con adición externa de ácido láctico (Figura 6.2, bloque ⑤).
6. Fermentación de suspensiones esterilizadas, agitadas inoculadas con *S. Typhimurium* con adición externa de ácido láctico (Figura 6.2, bloque ⑥).

Para las fermentaciones en suspensiones inoculadas únicamente con enterobacterias donde se adicionó ácido láctico, se siguió la metodología descrita a continuación:

- a. En las suspensiones inoculadas con *K. pneumoniae* (originarias del *pozol* o del caso clínico), la cantidad de ácido láctico adicionada se determinó previamente a partir de la fermentación en masas esterilizadas e inoculadas con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* del *pozol* (Figura 6.1, bloque ④). Estas concentraciones se muestran en la tabla 6.1 y se cuantificaron por HPLC con la metodología descrita en la sección 6.8.2.
- b. En las suspensiones inoculadas con *S. Typhimurium*, la cantidad de ácido láctico adicionada en cada tiempo de fermentación se determinó previamente a partir de la fermentación en suspensiones esterilizadas donde

se inocularon la bacteria láctica y la enterobacteria (Figura 6.2, bloque ①). Estas concentraciones se muestran en la tabla 6.2 y fueron cuantificadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con el método descrito en la sección 6.8.2.

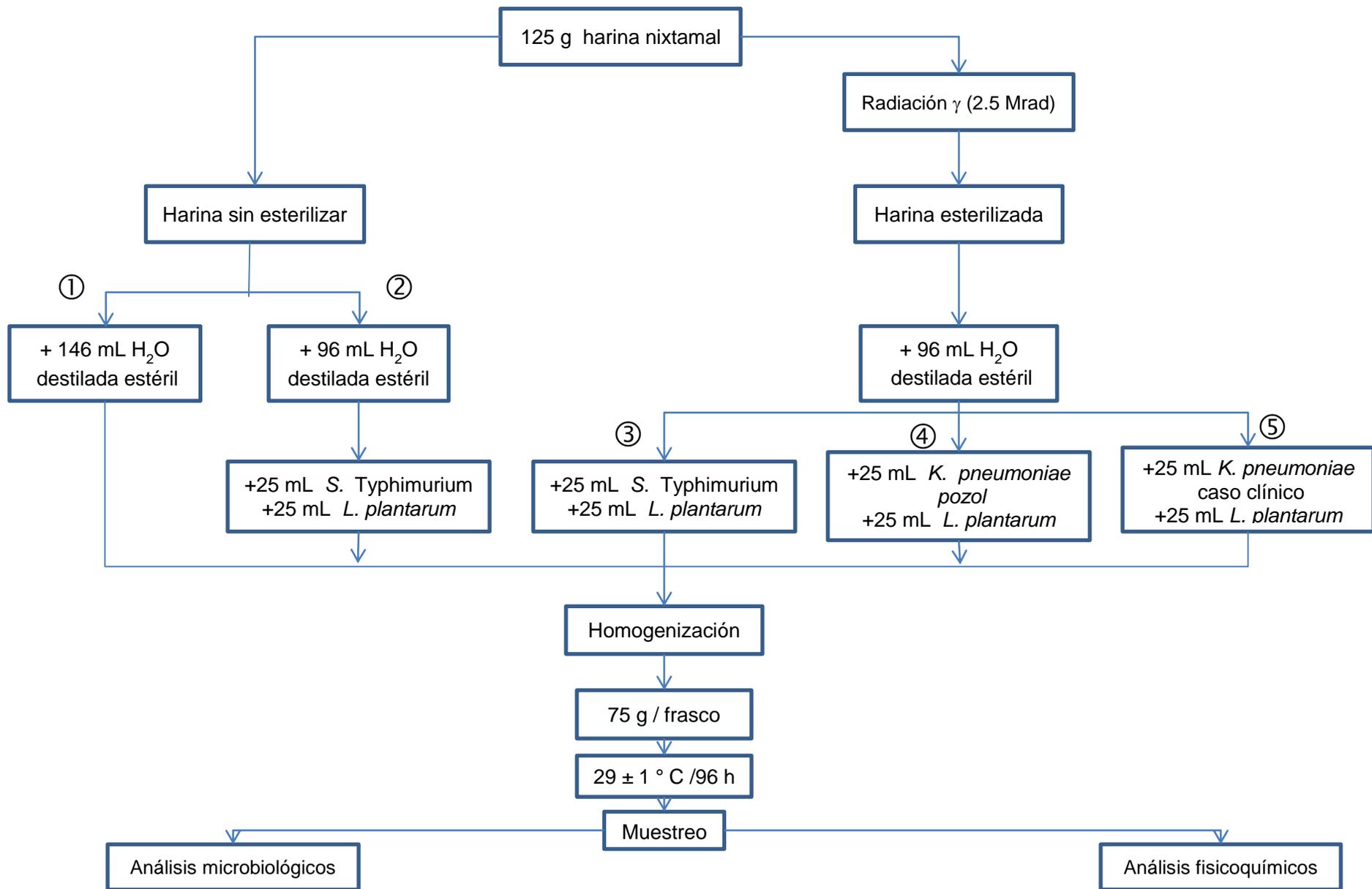


Figura 6.1. Metodología seguida en las fermentaciones realizadas en masas de harina de maíz nixtamalizado comercial. La concentración final de sólidos fue 46% (P/V).

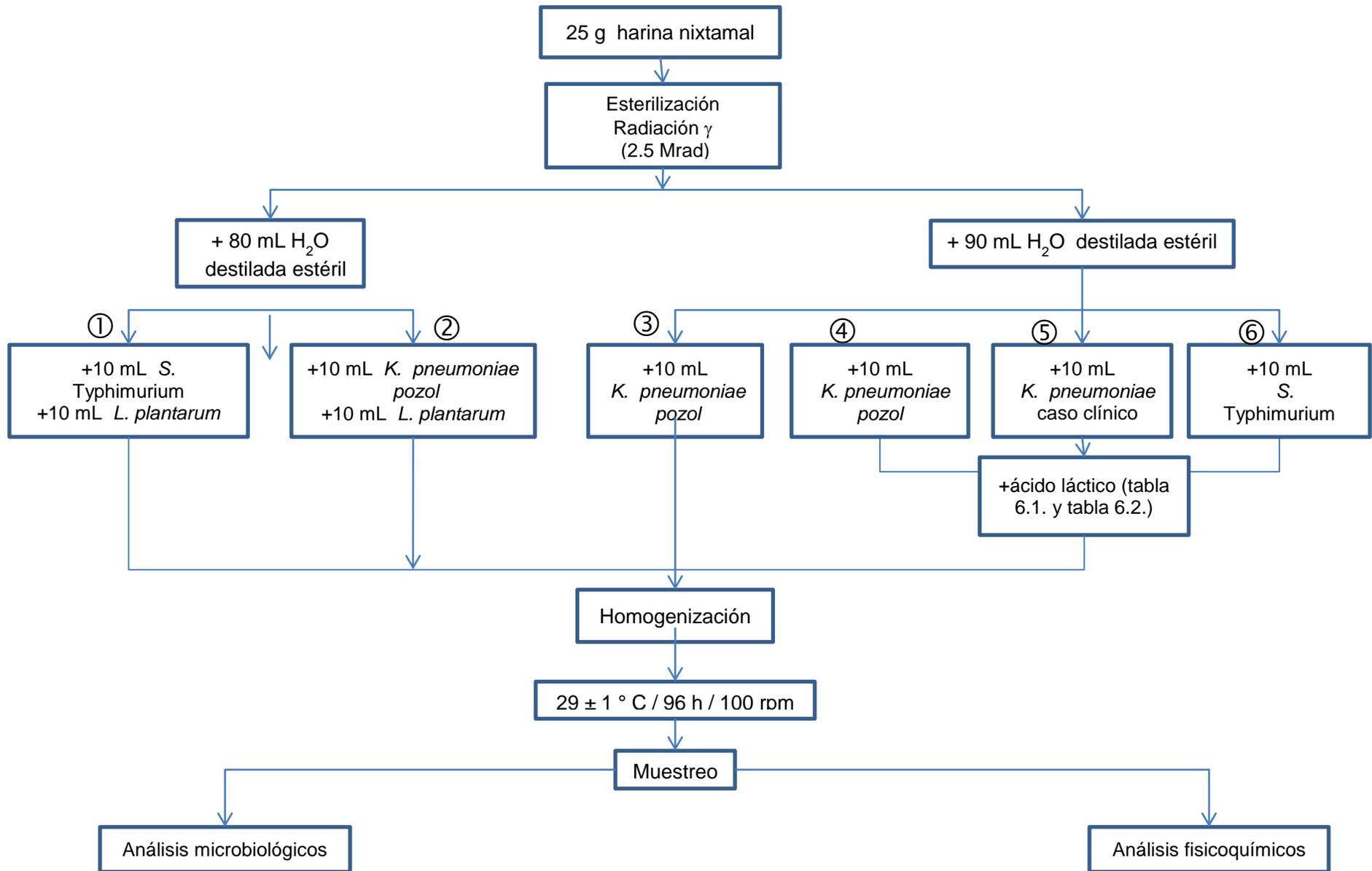


Figura 6.2. Metodología seguida en las fermentaciones realizadas en suspensiones de harina de maíz nixtamalizado comercial. La concentración final de sólidos fue 20% (P/V).

Tabla 6.1 Concentración de ácido láctico adicionada en cada tiempo de fermentación a las suspensiones 20% (P/V) esterilizadas, agitadas (100 r.p.m.) e inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol o *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso de diarrea.

Tiempo de muestreo (h)	Gramos de ácido láctico / 100 g harina
0	-
3	0.18
6	0.37
9	0.64
15	0.85
24	1.37
48	1.86
72	2.06
96	2.20

Tabla 6.2. Concentración de ácido láctico adicionada en cada tiempo de fermentación a las suspensiones 20% (P/V) esterilizadas, agitadas (100 r.p.m.) e inoculadas con *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Tiempo de muestreo (h)	Gramos de ácido láctico / 100 g harina
0	-
3	0.16
6	0.16
9	0.16
15	0.44
24	1.07
48	1.45
72	1.46
96	1.44

6.6. Muestreo

El muestreo se realizó de manera similar para las fermentaciones realizadas en masas y las fermentaciones realizadas en suspensión. Se tomaron muestras aleatorias por triplicado a las 0, 3, 6, 9, 15, 24, 72 y 96 horas. A cada muestra se le realizaron los análisis microbiológicos y fisicoquímicos que se detallan a continuación.

6.7. Análisis microbiológicos.

6.7.1. Preparación y dilución de la muestra para en análisis microbiológico.

6.7.1.1. Masas de harina de nixtamal.

Se pesaron 10 g de la masa en una bolsa para *Stomacher* estéril, para preparar una dilución primaria de la muestra. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1% (Oxoid) y homogenizaron en el equipo a velocidad media por 30 seg. De esta dilución se hicieron diluciones decimales consecutivas con el mismo diluyente.

6.7.1.2. Suspensiones de harina de nixtamal.

Se tomaron 5 mL de la suspensión para preparar una dilución primaria de la muestra y se depositaron en un matraz Erlenmayer con 45 mL de agua peptonada estéril al 0.1%. Se agitó para homogenizar durante 15 seg. De esta dilución se prepararon diluciones decimales consecutivas con el mismo diluyente.

6.7.2. Cuantificación de grupos microbianos.

6.7.2.1. Bacterias lácticas.

Se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias de bacterias lácticas contenidas en un mililitro de suspensión o gramo de masa por el método de extensión superficial en placa de agar. Se inocularon 0.1 mL de la dilución de la muestra respectiva por duplicado en cajas de Petri con 15 mL de agar MRS (agar De Mann Rogosa Sharpe; Oxoid). Las cajas inoculadas se incubaron invertidas a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Se consideró para la cuantificación las cajas con el número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo (25-250 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de suspensión (UFC/g o mL). Así mismo, se calculó la desviación estándar. Para corroborar que las colonias desarrolladas correspondían a bacterias lácticas se observó en algunas de las colonias tomadas al azar, que fueran Gram-positivos y catalasa-negativos.

6.7.2.2. Enterobacterias.

La cuantificación se realizó por el método de extensión superficial en placa de agar. Se tomaron 0.1 mL de la dilución correspondiente por duplicado y se inocularon en cajas de Petri con el agar respectivo. Para la cuantificación de enterobacterias totales se inoculó en agar bilis-rojo-violeta con glucosa (Oxoid). Para la cuantificación de enterobacterias lactosa-negativas o lactosa-positivas (*Salmonella Typhimurium* o *Klebsiella pneumoniae* respectivamente), se inoculó en agar Mac Conkey (Oxoid). Las cajas inoculadas se incubaron invertidas a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24. Se contaron las colonias desarrolladas en las cajas de Petri que estuvieran dentro del rango estadísticamente confiable (15 a 150 colonias).

Para contabilizar las enterobacterias naturales de la masa de harina de maíz nixtamalizado se consideraron las colonias rojas o rosas con precipitado y halo rojo alrededor de las colonias que desarrollaron en el agar bilis rojo violeta con glucosa. Para cuantificar a *K. pneumoniae*, se consideraron las colonias con rojas o rosas con precipitado y halo rojo alrededor, indicativo de haber metabolizado la lactosa (lactosa-positivas) y precipitación de sales biliares desarrolladas en el agar Mac Conkey. Las características morfológicas contabilizadas en el caso de *S. Typhimurium* para realizar el cómputo fueron colonias translúcidas como indicativo de no haber

metabolizado el carbohidrato (lactosa-negativas). Para algunas colonias tomadas al azar durante las cuantificaciones, se verificó por microscopía el carácter Gram-negativo de los bacilos desarrollados. Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el número de unidades formadoras de colonias en un gramo o mililitro de masa o suspensión, según fuera el caso (UFC/g ó mL).

6.8. Análisis fisicoquímicos.

6.8.1. pH.

Se tomaron 5 g de masa ó 5 mL de suspensión de la muestra respectiva y se adicionaron 25 mL de agua destilada, neutralizada y desgasificada. Se homogenizó la muestra y midió el pH con un potenciómetro (Jenway-3020).

6.8.2. Concentración de ácidos orgánicos.

La determinación de ácidos orgánicos se efectuó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con la metodología desarrollada para la cuantificación de ácidos orgánicos de maíz, nixtamal o *pozol* (Santillana, 1995).

6.8.2.1. Descripción del equipo de cromatografía y método de inyección de la muestra.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (Perkin Elmer serie 250) con bomba isocrática e inyector (Valco) con loop de 100 μ L, una precolumna catión H^+ (Bio-Rad) y una columna Aminex HPX-87H (Biorad) con un tamaño de partícula de 9 μ m y una longitud de 300 x 7.8 mm de diámetro. Así mismo, se utilizaron un detector de índice de refracción (Perkin Elmer-LC30) y un integrador personal (Perkin Elmer-1020S).

Se utilizó como eluyente (fase móvil) una solución 0.01 N de ácido sulfúrico (Baker R.A.) preparado con agua desionizada. Se filtró en un equipo Millipore, se empleó una membrana de acetato de celulosa de 0.45 μ m de diámetro de poro (Sartorius). Se desgasificó con vacío y se ultrasonizó (Branson-2210) por 15 min. Finalmente se

colocó en la bomba del cromatógrafo para la estabilización del equipo con un flujo de 0.6 mL por minuto. Se cargó el loop con 200 µL de muestra, para tenerlo completamente lleno con la misma e inyectó la muestra: El tiempo de corrida para cada determinación fue aproximadamente 17.5 min. Como curva de calibración se prepararon e inyectaron al equipo, una serie de diluciones de una solución estándar de lactato de litio (Sigma) al 1% (92.7% de ácido láctico) y de una solución estándar de acetato de sodio (Sigma) al 1% (82% de ácido acético).

Cada muestra se analizó por duplicado. La concentración de ácidos orgánicos contenidos en la muestra analizada se reportó en gramos del ácido orgánico contenidos en 100 g de harina, para el cálculo se consideraron las diluciones efectuadas en la muestra, la concentración de sólidos contenidos en las masas fermentadas y/o en las suspensiones fermentadas y el porcentaje de pureza de la solución estándar.

6.8.2.2. Preparación de la muestra.

Se tomaron 5 g de masa o 10 mL de suspensión de la muestra y se agregaron 20 mL de agua destilada con una temperatura de 65°C. Se homogenizó la muestra durante 3 min a 10,000 UpM (velocidad media; Ultraturax-Janke & Kunkel). La muestra homogénea fue centrifugada a 10,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C (centrífuga Beckman J2-21M). Se eliminó el sedimento de la muestra y el sobrenadante se aforó a 25 mL. Se congeló durante cuatro días a una temperatura de -20°C para la eliminación de sólidos suspendidos.

Se descongeló la muestra a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). La muestra se agitó y se repartieron 3 mL en dos tubos *ependorf* de 1.5 mL de capacidad. Se centrifugó en una microcentrifuga (Tomy Kogyo HF-130) a 6,000 r.p.m. durante 15 min para eliminar la mayor cantidad de sólidos suspendidos. El sobrenadante se filtró con un prefiltro (Millipore-HVLP01300) y una membrana de 0.22 µm (Millipore AP25-01000).

Se activó un cartucho Sep-pak C18 (Millipore-WAT051910) para retener los compuestos hidrofóbicos de la muestra y obtener así una muestra más limpia. Se eluyeron 2 mL de una mezcla agua acetonitrilo en proporción 9:1, se dejó reposar dos minutos y después se eluyeron 5 mL de agua destilada.

Se tomaron 2 mL de la muestra filtrada con una jeringa de plástico de 5 mL de capacidad, a la cual se le conectó un cartucho Sep-pak activado. Se eluyó el volumen de la muestra descrito. Se adicionaron 2 mL de agua destilada y eluyeron. Se eluyó de nuevo al adicionar 1 mL de una mezcla de agua –acetonitrilo en proporción 85:15. Finalmente, se adicionaron 3 ó 4 mL de agua destilada y se eluyó de la misma forma. Se aforó a 10 mL con agua destilada. Esta muestra se inyectó en el equipo de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) que se describió en la sección anterior (6.8.2.1).

6.9. Análisis estadístico.

Para determinar si las diferencias observadas en el desarrollo de las enterobacterias para cada tiempo de muestreo durante las fermentaciones realizadas fueron significativas ($P < 0.05$), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey con el uso del programa GraphPad Prism 5. En el Anexo II se presentan los resultados del análisis estadístico en forma de tablas.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Efecto de la microbiota natural de la masa de harina de nixtamal en la permanencia de las enterobacterias.

La importancia de los conceptos ecológicos en la comprensión del desarrollo de los microorganismos en los alimentos es fundamental en el aseguramiento de la calidad moderna, en la predicción, y desarrollo de estrategias o en el análisis de riesgos para prevenir enfermedades o descomposición de los mismos. También son la base para el uso de los microorganismos en la producción de alimentos fermentados y bebidas, y para su empleo como probióticos, iniciadores o agentes de biocontrol (Giraffa, 2004). La microbiota del *pozol* está formada por bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias del género *Bacillus*, levaduras y mohos (Nuraida *et al.*, 1995; Wachter *et al.*, 2000). Este consorcio microbiano podría influir en el crecimiento de los distintos grupos que se evalúan en el presente estudio. En particular, podría favorecer la persistencia de las enterobacterias a pesar del crecimiento de las bacterias lácticas. Por lo cual se determinará el desarrollo de los grupos microbianos de estudio y naturalmente presentes en las masas de harina de maíz nixtamalizado. Así mismo, se evaluará el efecto que tiene esta microbiota en la concentración de *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) inoculada en masas no esterilizadas ya que al no esterilizar el sustrato se logró la presencia de los grupos microbianos contenidos naturalmente en él, y en masas esterilizadas para lograr eliminar la microbiota natural contenida en ella; e inoculadas o no con *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) aislado del *pozol*.

7.1.1. Fermentación de masas de harina de nixtamal no esterilizadas sin inocular.

La concentración de bacterias lácticas naturalmente contenidas en la masa de harina de maíz nixtamalizado al inicio de la incubación fue 10^3 UFC/g, las cuales se incrementaron y alcanzaron su máximo desarrollo a las 24 h (10^7 UFC/g). También se cuantificó una concentración inicial de enterobacterias naturalmente contenidas como microbiota de la masa de 10^2 UFC/g y en 24 h crecieron a 10^6 UFC/g. A partir de las 24 h, las concentraciones de ambos grupos microbianos permanecieron constantes hasta 96 h. Por otra parte, el pH inicial de la masa fue 6.4, y disminuyó hasta 5.2 a 96 h. La concentración de ácido láctico se incrementó desde 0.21 g/100g al inicio hasta 0.8 g/100 g a las 96 h (Figura 7.1).

De acuerdo a las especificaciones microbiológicas para este sustrato (NOM-187-SSA1/SCFI-2002), el límite máximo permitido para la presencia de coliformes en la harina es 100 UFC/g y en masa es 2;000 UFC/g, la concentración de las enterobacterias naturales del sustrato al inicio de la fermentación están dentro del límite permitido. Sin embargo, el desarrollo después de 24 h de incubación a 10^6 UFC/g, generó que se elevara esta concentración, lo cual compromete la inocuidad del producto fermentado y la salud de los consumidores de pozol.

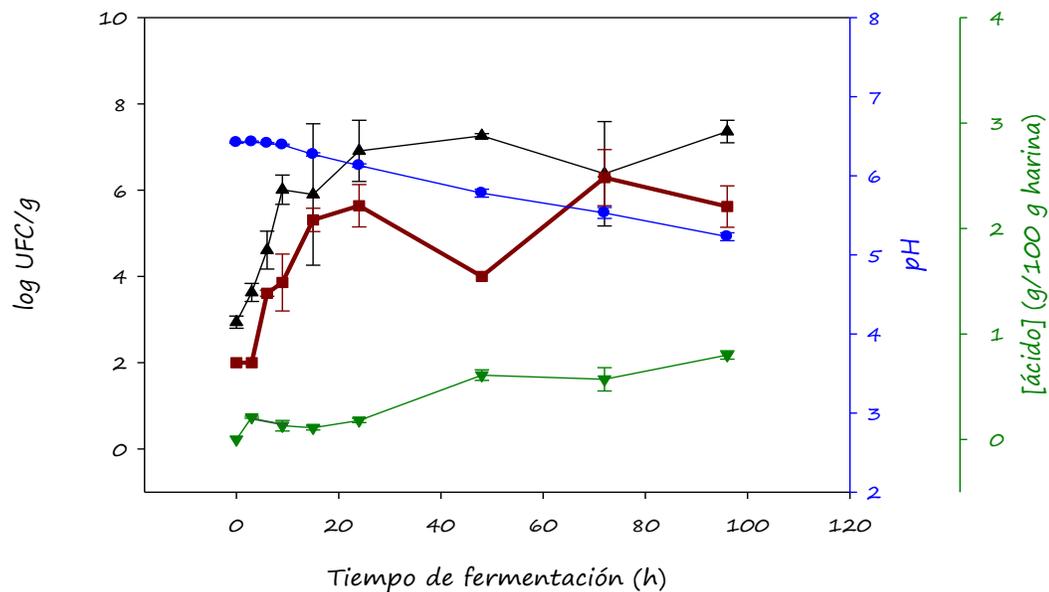


Figura 7.1. Fermentación de masas no esterilizadas sin inocular.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

7.1.2. Fermentaciones de masas de harina de nixtamal no esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

Se inoculó la bacteria láctica al inicio de la fermentación con una concentración de 10^7 UFC/g. Esta concentración determinada incluyó a las LAB naturales (como se mencionó previamente la concentración inicial de LAB naturales del sustrato fue 10^3 UFC/g). Se presentó un incremento en las cuentas de las bacterias lácticas (que incluyen las naturales del sustrato y las inoculadas) a partir del inicio hasta 10^9 a las 72 h, aunque para las 96 h disminuyó a 10^7 UFC/g. (Figura 7.2).

Las enterobacterias a partir de la concentración inicial inoculada (10^6 UFC/g) crecieron hasta 10^8 UFC/g en las primeras 15 h, después de este punto se presentó un decremento, se alcanzó la concentración mínima a las 48 h (10^2 UFC/g), la cual se mantuvo hasta 96 h (Figura 7.2).

Las enterobacterias cuantificadas incluyeron las contenidas naturalmente en el sustrato. El conteo de éstas se realizó al inocular la muestra diluída en dos medios diferentes: (a) El agar bilis rojo violeta con glucosa para detectar las enterobacterias totales presentes, con lo cual se detectaron los microorganismos de este género naturalmente contenidos en el sustrato (en masas no esterilizadas se detectaron concentraciones de 10^2 UFC/g) además de los microorganismos inoculados (10^5 UFC/g); y (b) El agar Mac Conkey, que se empleó para cuantificar solamente a las enterobacterias con incapacidad para metabolizar la lactosa, que incluyen a la bacteria inoculada es decir, *S. Typhimurium*. Por consiguiente la cuantificación de las enterobacterias para esta fermentación se refiere a la concentración celular global del grupo (enterobacteria inoculada y microbiota normal de enterobacterias).

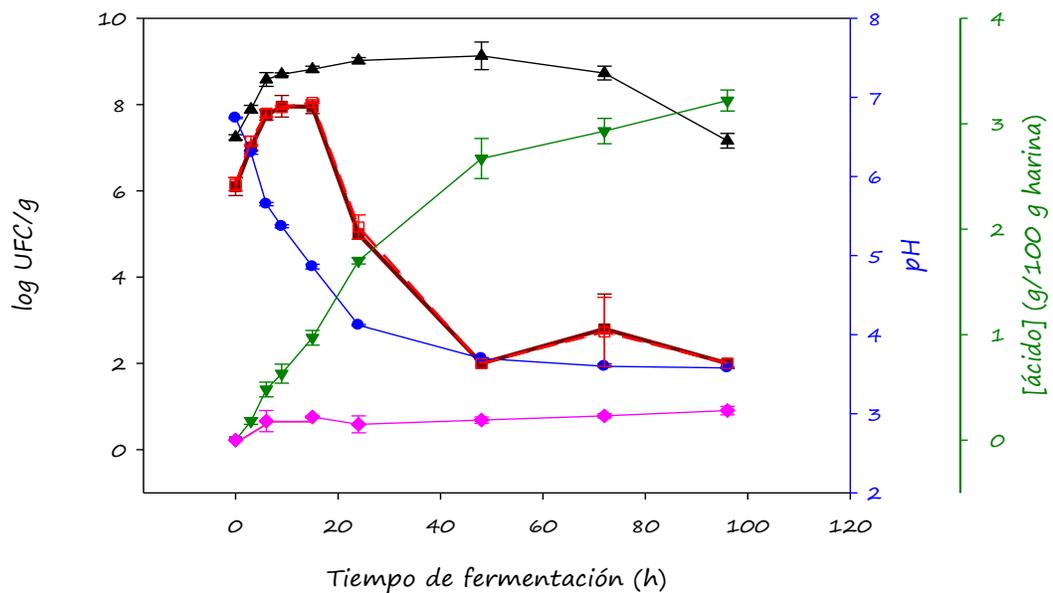


Figura 7.2. Fermentación de masas no esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias totales (-□-), enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-), ácido acético (-◆-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

El pH inicial en esta fermentación fue de 6.7 y disminuyó continuamente hasta 3.7 a las 72 h, permaneció constante durante el resto de la fermentación. La concentración de ácido láctico se incrementó desde 0.17 g/100 g hasta 3.22 g/100 g a las 96 h. También se detectó ácido acético con una concentración inicial de 0.18 g/100 g la cual aumentó a 0.28 g/100g al final de la fermentación (Figura 7.2).

7.1.3. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para esta fermentación *L. plantarum* se inoculó en una concentración de 10^7 UFC/g y creció hasta alcanzar 10^9 UFC/g a las 24 h, se mantuvieron en este nivel hasta las 96 h. *S. Typhimurium* se inoculó en una concentración de 10^5 UFC/g, se desarrolló hasta 10^7 UFC/g a las 9 h. Este nivel de crecimiento se mantuvo hasta las 24 h de fermentación. A partir de este momento se observó una disminución en la concentración de este microorganismo y a las 96 h ya no fue detectado (Figura 7.3).

El pH inicial de la fermentación fue de 6.2 y a las 48 h disminuyó a 3.8, valor que se mantuvo hasta el final de la fermentación (96 h). Únicamente se detectó ácido láctico con una concentración inicial de 0.16 g/100 g se incrementó a 2.9 g/100 g a las 96 h (Figura 7.3).

En la Tabla 7, se presenta la variación en la concentración de ácido láctico y pH en los puntos donde se observó la disminución en la concentración celular y/o la eliminación de las enterobacterias empleadas en las distintas fermentaciones en masas de harina de nixtamal. En esta tabla se incluyeron únicamente las concentraciones de ácido láctico y pH cuantificados cuando se inicia la muerte de las enterobacterias empleadas en las masas de harina de nixtamal, así como la cuantificación de ambos parámetros cuando ya no se observaron Unidades Formadoras de Colonias en las muestras de las fermentaciones indicadas. Así mismo se construyó un gráfico comparativo del promedio en la concentración de las enterobacterias y el pH promedio durante el transcurso de las fermentaciones comparadas y se muestra en la figura 7.4.

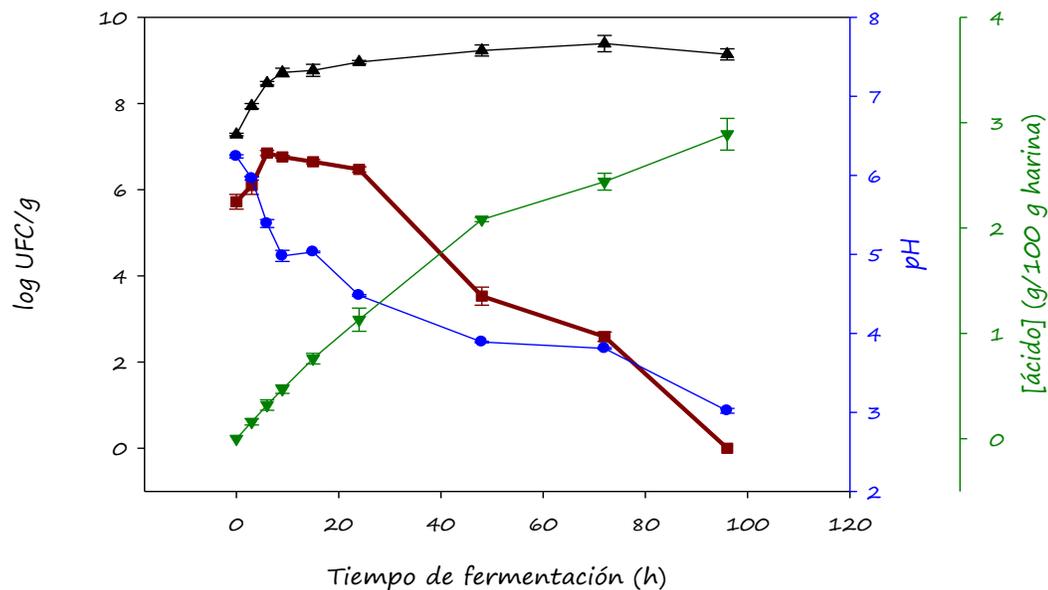


Figura 7.3. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-), ácido acético (-◆-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Al observar las variaciones en la concentración del ácido láctico y pH en los tiempos en que se inicia la muerte del grupo de enterobacterias se notó que en las masas no esterilizadas y sin adición de inóculo, no se eliminaron las enterobacterias naturales presentes en la harina de maíz nixtamalizada, incluso se observó una fase estacionaria a partir de las 15 h de fermentación (Figura 7.4). En la tabla por lo tanto, se indicó no haberse presentado una disminución y/o eliminación en la concentración de enterobacterias naturales de la masa (Tabla 7.1; Condición A). La concentración de ácido láctico generada en la fermentación donde se desarrolló solamente la microbiota natural del sustrato fue de 0.1 g/100 g y un pH de 6.3. Se destaca que en este sustrato las bacterias lácticas nativas únicamente estuvieron en una concentración de 10^2 UFC/g y desarrollaron hasta 10^7 UFC/g y generó bajas concentraciones de ácido láctico y poco descenso del pH. Así mismo se observó la permanencia del grupo de enterobacterias naturales del sustrato en concentraciones de 10^5 y 10^6 UFC/g a partir de las 15 h. Esto sugiere que las escasas condiciones de acidez favorecieron la permanencia en altos números y una fase estacionaria más larga en esta fermentación.

Al comparar la fermentación en masas no esterilizadas sin inocular, con respecto a las masas no esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium*, cuya característica adicional fue el desarrollo de la microbiota nativa del sustrato, se presentó una disminución del número de enterobacterias a partir de las 15 h de fermentación, el haber *inoculado L. plantarum* a las masas además de la presencia de las bacterias lácticas naturales de la masa generó una mayor disminución de pH y mayor concentración de ácido láctico (Figura 7.4; Tabla 7.1, Condición B). La disminución de *S. Typhimurium* en la fermentación de masas no esterilizadas inoculada con la bacteria láctica, puede deberse a estas condiciones de acidificación y mayor decremento de pH. Sin embargo *S. Typhimurium* sobrevivió, aún cuando para este tiempo se detectó un pH de 4.9 (Figura 7.4) y concentraciones de ácido láctico de 1.0 g/100 g de harina, ácido acético de 0.2 g/100 g. Incluso aún se detectaron células viables para las 96 h de fermentación, cuando se habían generado una concentración de ácido láctico de 3.2 g/100 g de harina y 0.3 g/100 g de ácido acético (Tabla 7.1, Condición B), y haber disminuído el pH a 3.0 (Figura 7.4).

En las masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y cada una de las enterobacterias utilizadas en el estudio, no se observó la persistencia. En las masas inoculadas con *S. Typhimurium* y/o *K. pneumoniae* aislada del caso clínico (Figura 7.4), después de desarrollarse y presentar una idiofase desde las 6 h y hasta las 15 o 24 h aproximadamente, se inició su muerte. En este período para las dos fermentaciones el pH disminuyó a 4.5 y la concentración de ácido láctico se incrementó de 0.3 a 1.0 g/100 g de harina (Figura 7.4; Tabla 7.1., Condiciones C y E, respectivamente). Cuando la concentración del ácido láctico fue de 2.1 g/100 g de harina y el pH había disminuído para ambas fermentaciones en general a 3.7 (Tabla 7.1, condiciones C y E), ya no se detectaron enterobacterias en ambas fermentaciones.

Los resultados del análisis estadístico se encuentran en el Anexo II. Éstos mostraron que la fermentación de masas de harina de nixtamal no esterilizadas y no inoculadas (donde se desarrollaron los grupos microbianos naturales del sustrato), tuvieron una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a todas las fermentaciones en masas no esterilizadas y esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica además de cada una de las enterobacterias empleadas en el estudio (Tabla A.II1; Fermentaciones comparadas A, B y C). Esto corroboró las observaciones en diferencias en el desarrollo ya discutidas.

Así mismo, los resultados del análisis estadístico al comparar el desarrollo de enterobacterias en masas inoculadas con *S. Typhimurium* y *L. plantarum* en los sustratos esterilizados y no esterilizados (Tabla A.II.1; Fermentaciones comparadas D), mostraron diferencias significativas durante toda la fermentación, lo cual confirmó que el desarrollo de la enterobacteria en presencia de la microbiota es distinta a la ausencia de esta última.

La comparación entre las fermentaciones en masas no esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica y *S. Typhimurium* contra masas esterilizadas inoculadas con la misma bacteria láctica y *K. pneumoniae* aislada del caso clínico fueron significativamente distintas desde el inicio de la fermentación (Tabla A.II.1; Fermentación comparada E). El realizar la fermentación en un sustrato no esterilizado (masas no esterilizadas), originó que hayan existido enterobacterias nativas del mismo, además de que en ambas fermentaciones se inocularon microorganismos entéricos de género y especie distinta, lo anterior pudo ser la causa de esta diferencia significativa.

Al analizar los resultados obtenidos durante las fermentaciones realizadas en masas, se resume:

- a) El crecimiento de *L. plantarum* en las fermentaciones donde se inoculó, se presentó de manera similar, es decir, se incrementaron desde el inicio de la fermentación (10^7 UFC/g), en las siguientes 15 a 24 horas alcanzaron su desarrollo máximo (10^9 UFC/g), y se mantuvieron en fase estacionaria hasta las 96 horas en los mismos niveles. En la fermentación donde no se adicionaron bacterias lácticas (masa no esterilizada sin inocular), la concentración de este grupo es en consecuencia menor (10^3 UFC/g inicio y permanecen constantes a partir de las 24 h en 10^7 UFC/g), sin embargo el comportamiento durante la fermentación fue similar.
- b) Como consecuencia del desarrollo y metabolismo de las bacterias lácticas durante la fermentación se generó la producción de ácido láctico (principalmente) y de ácido acético en baja concentración (excepto para la fermentación donde se esterilizó el sustrato). Así mismo, la producción de estos metabolitos originó la disminución del pH, que de igual manera decayó en función del incremento en el número de bacterias lácticas.

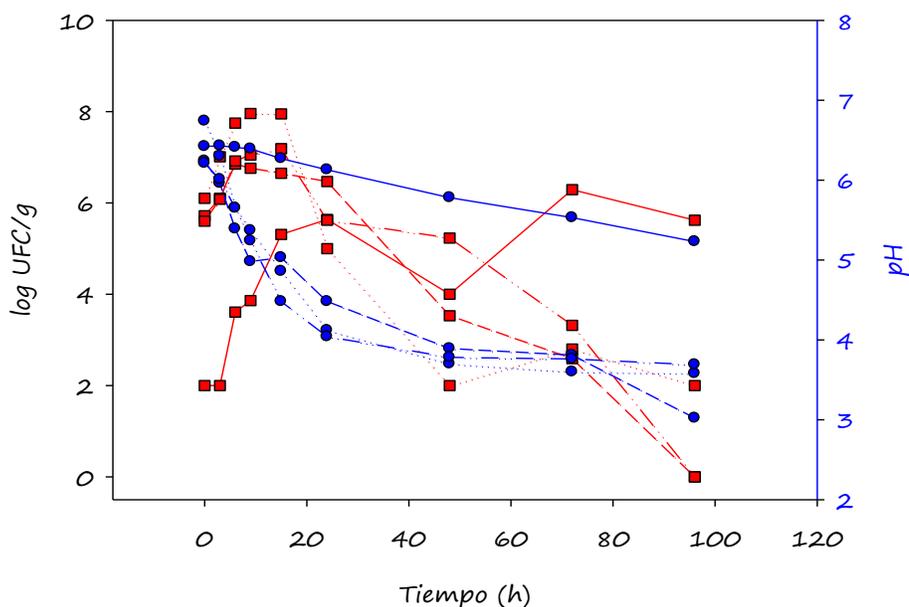


Figura 7.4. Concentración de enterobacterias en presencia o ausencia de la microbiota natural durante la fermentación en masas de harina de maíz nixtamalizado.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ Masa sin esterilizar sin inocular, concentración de enterobacterias naturalmente contenidas (—■—; línea roja continua) y pH (—●—; línea azul continua); masas no esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028, concentración de enterobacterias totales (····■····; línea roja punteada) y pH (····●····; línea azul punteada); masas esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028, concentración de enterobacterias inoculadas (---■---; línea roja intermitente) y pH (---●---; línea azul intermitente); masas esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del caso de diarrea, concentración de enterobacterias inoculadas (---■····; línea roja punteada intermitente) y pH (---●····; línea azul punteada intermitente).

- c) En las masas no esterilizadas y sin adición de inóculo, también se produjo ácido láctico aunque en menor concentración. Esta escasa producción de ácido láctico originó un decremento de pH en menor grado en comparación con los sustratos no esterilizados e inoculados con ambos grupos microbianos de estudio.
- d) En las masas de harina de nixtamal no esterilizadas se presentó el desarrollo de las enterobacterias nativas de este sustrato y no se observó disminución en la concentración de las mismas.
- e) Las enterobacterias que se inocularon y desarrollaron en los sustratos no esterilizados desde el inicio de la fermentación (10^5 UFC/g), aumentaron a 10^7 UFC/g durante el crecimiento, y durante el resto de la fermentación sus números decrecieron hasta 10^2 UFC/g, sin embargo no se eliminaron a pesar de la producción de ácidos orgánicos y de la disminución de pH, provocado por las bacterias lácticas.

- f) En los sustratos esterilizados, en contraparte al inocularlas se presentó un ligero incremento de este grupo durante las primeras horas de fermentación, sin embargo a partir de las 15 horas empezó la muerte de este grupo microbiano y a las 96 horas ya no se encontraron presentes las enterobacterias inoculadas.

- g) En ambos sustratos analizados (esterilizados y sin esterilizar) inoculados con *L. plantarum*, *S. Typhimurium* y/o *K. pneumoniae* aislado del caso clínico, las condiciones generadas por la fermentación láctica, fueron muy similares, esto es, la concentración de ácido láctico cuando se inició la muerte de las enterobacterias fue aproximadamente 1.0 g/100 g de harina y el pH fue aproximadamente 4.5.

La diferencia más notoria en estos resultados, y resulta importante resaltarla, fue la permanencia de las enterobacterias inoculadas en los sustratos no esterilizados, a pesar de que:

- i) La fase de muerte se inició 9 horas antes que en los sustratos esterilizados,

- ii) Se generaron condiciones similares durante la fermentación láctica,

Esta estabilidad en el desarrollo de las enterobacterias fue mas persistente cuando se realiza la fermentación en masas de harina de nixtamal y no se generan condiciones de acidificación suficientes.

Los resultados anteriores indican que la fermentación láctica que se presenta en el *pozol*, contribuiría a la eliminación de las enterobacterias presentes en el mismo. Sin embargo, en las masas de harina de nixtamal no esterilizadas, el desarrollo los miembros de la microbiota natural de este sustrato indican tener un efecto que favorece la permanencia del grupo de las enterobacterias. Ya sea nativas de la harina o inoculadas artificialmente (como se realizó en este estudio) en el mismo sustrato, la presencia de otros miembros de la microbiota del mismo tienen un efecto de protección que conlleva a la presencia del grupo microbiano durante la fermentación. Los niveles en el desarrollo de las bacterias entéricas, disminuyen dependiendo del grado de acidificación y disminución de pH que se presente, pero a pesar de tener condiciones ácidas, en las masas de harina de nixtamal no esterilizados no se generó la eliminación.

Tabla 7.1. Variaciones en la concentración de ácido láctico y pH durante la evaluación de la permanencia y/o eliminación de enterobacterias en fermentaciones de masa de harina de nixtamal bajo diferentes condiciones.

Se destaca entre paréntesis el tiempo en que se detectaron la concentración del ácido láctico y el pH.

CONDICIÓN	SUSTRATO	INÓCULO	INICIO MUERTE		NO DETECCIÓN (96 h)		ELIMINACIÓN
			[ácido láctico] (g/100 g)	pH	[ácido láctico] (g/100 g)	pH	
A	Masa no esterilizada	-	Nohay fase de muerte ^a	Nohay fase de muerte ^a	0.8 ^a	5.2 ^a	NO
B	Masa no esterilizada	<i>L. plantarum</i> Pz-9 <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	1.0 (15 h)	4.9 (15 h)	3.2	3.6	NO
C	Masa esterilizada	<i>L. plantarum</i> Pz-9 <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	1.1 (24 h)	4.5 (15 h)	2.9	3.0	SI
D	Masa esterilizada	<i>L. plantarum</i> Pz-9 <i>K. pneumoniae</i> <i>pozol</i>	1.6 (48 h)	3.8 (48 h)	2.0	3.7	NO
E	Masa esterilizada	<i>L. plantarum</i> Pz-9 <i>K. pneumoniae</i> clínico	1.0 (15 h)	4.5 (15 h)	2.1	3.7	SI

a. Para esta fermentación la concentración de ácido láctico se incrementó desde 0.1 hasta 0.8 g/100 g. El pH disminuyó desde 6.4 hasta 5.2.

Si la producción de ácido durante una fermentación láctica es baja, o si el pH no disminuye lo suficiente, origina que la microbiota que debió inhibirse pueda desarrollar (Giraffa, 2004), lo cual ocurrió en las masas no esterilizadas no inoculadas. Además, existen estudios que demuestran la adaptación de algunas bacterias patógenas bajo ambientes sub-letales de estrés, y esto ayuda a que microorganismos indeseables desarrollen. La actividad de los microorganismos en alimentos es el resultado de reacciones de estrés en respuesta a los cambios en las condiciones físicas y químicas del microambiente, a la habilidad de colonizar la matriz alimenticia y crecer en una heterogeneidad espacial. Por otra parte, en la mayoría de los ecosistemas de alimentos las poblaciones microbianas se forman como una comunidad en alta densidad, la generación del alimento fermentado no es el resultado de una célula en particular. Por lo tanto, el crecimiento, sobrevivencia y actividad de cualquier especie o cepa, sin importar si es patógeno o microbiota deseable dependerá de la presencia de otros microorganismos y de las interacciones ecológicas célula-célula, las cuales casi siempre ocurren en fase sólida (Giraffa, 2004).

Diversos factores podrían favorecer la permanencia del grupo de enterobacterias en este alimento como consecuencia del efecto protector de la microbiota natural de la harina de nixtamal. El *quórum sensing*, entre los miembros de la microbiota, ayudaría a la comunidad de enterobacterias a prepararse a las condiciones de acidez y pH que se generan en las masas de harina de nixtamal. Se ha encontrado que algunas de estas señales en *S. Typhimurium* se activan e interactúan con otras señales generadas por otras bacterias cuando se cultivan en caldo Luria a pH 4.0 (Richlyk y Barrow, 2005). Withers *et al.* (2001), mencionan que en *E. coli* los sistemas de *quórum sensing* están implicados en el metabolismo de aminoácidos. Así mismo en esta bacteria, un segundo tipo de *quórum sensing* se encuentra relacionado con cambios fenotípicos que incrementan la habilidad de las células individuales para sobrevivir. Entre estos cambios se encuentran la regulación del catabolismo específico de aminoácidos durante la entrada a la fase estacionaria, la división celular y la replicación del DNA.

Otros de los factores en los que la microbiota natural de la harina de nixtamal pudo haber protegido a las enterobacterias en la fermentación es la metabiosis. Existen innumerables formas de interdependencia entre los diferentes organismos. El término metabiosis describe la dependencia de un organismo sobre otro para generar un ambiente favorable. Pueden existir situaciones en donde un organismo genera nutrientes mejorando el crecimiento de otro, como sería la generación de aminos biogénicos durante la hidrólisis de aminoácidos. Algunas bacterias lácticas degradan arginina a ornitina (precursor de la formación de putrescina) (Mac Faddin, 2003; Holt *et al.*, 2003). La co-inoculación de enterobacterias ornitín-descarboxilasa positivas (y por tanto

productoras de putrescina), con bacterias lácticas que degradan la arginina provoca un incremento 6 a 15 veces mayor de la amina biógena en comparación con la cantidad generada por el cultivo puro (Gram *et al.*, 2002). En este contexto durante la fermentación en masas con presencia de la microbiota normal, pudo existir esta interrelación biológica, ya que se encuentran en el *pozol* microorganismos con capacidad de generación de aminoácidos que a su vez serían utilizadas por las enterobacterias para la generación de putrescina. La generación de compuestos aminados podría elevar temporalmente el pH en el microambiente donde se encuentre presente la enterobacteria y favorecer la permanencia.

Aunque en este trabajo no se determinaron grupos de mohos y levaduras, en estudios previos (Wacher, 1995), se determinaron los grupos de mohos, levaduras y mesófilos aerobios no lácticos en *pozol* de San Cristóbal de las Casas, Chis. después de la molienda del maíz y durante la fermentación. En el primer caso, la concentración de los dos primeros fueron menores a 10^2 UFC/g y del tercero 10^5 UFC/g. Después de 30 h de fermentación la concentración de levaduras se incrementó a 10^6 UFC/g, de mohos a 10^4 UFC/g y de mesófilos aerobios no lácticos a 10^7 UFC/g.

Algunos microorganismos son capaces de emplear ácidos orgánicos (bajo condiciones aeróbicas) en un metabolismo empleado para generar energía (Aziza y Amrane, 2006; Adour *et al.*, 2002; Lindgren y Dobrogrosz, 1990). Se ha reportado la presencia de mohos y levaduras en el *pozol* (Ulloa, 1974). Algunas levaduras y *G. candidum* aislados del *pozol* fueron capaces de desarrollarse en medio base levadura/nitrógeno suplementado con lactato como fuente de carbono en períodos de incubación de 2 a 7 días a 25°C, lo cual sugirió que el lactato es un factor importante en la ecología del alimento (Nuraida *et al.*, 1995). Así mismo, se realizaron estudios del hongo en un medio definido suplementado con concentraciones similares de algunos carbohidratos que se han detectado en el *pozol* (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa al 0.25% P/V) en presencia y ausencia de ácido láctico. Se obtuvo un mejor desarrollo del hongo y se incrementó el consumo de carbohidratos cuando el ácido láctico se adicionó al medio y cuando el pH se encontraba en 3.5 y 4.7 (Camacho, 1996). En el *pozol* podría suponerse que el ácido láctico producido durante la fermentación acelera el crecimiento de *G. candidum* que ha empezado a crecer utilizando trazas de carbohidratos solubles a la masa. Es probable que se haya presentado otro fenómeno de metabiosis entre la microbiota micótica y levaduriforme presente en el *pozol*, las bacterias lácticas y las enterobacterias. Es posible que el primer grupo de microorganismos asimile los ácidos orgánicos generados durante la fermentación, que genere una elevación del pH y se vea favorecida en estos microambientes la estancia y/o estabilidad de las enterobacterias.

7.2. Efecto de las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación láctica en la permanencia de las enterobacterias durante la fermentación de masas de harina de nixtamal.

Las bacterias lácticas producen una variedad de compuestos capaces de afectar el desarrollo de las enterobacterias. En el *pozol* el grupo de las bacterias lácticas se presenta durante toda la fermentación y se ha indicado que su desarrollo genera las condiciones de acidez y pH característicos de este alimento. Para evaluar la actividad antimicrobiana que se presenta como consecuencia del desarrollo de este grupo, se realizaron fermentaciones de masas de harina de nixtamal comercial esterilizadas e inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 aislada del *pozol*. Las masas fueron también inoculadas con distintas enterobacterias y se observó la permanencia de cada una de ellas durante el transcurso de la fermentación. En concreto, se inoculó una enterobacteria aislada del alimento fermentado (*Klebsiella pneumoniae*) y se comparó con la permanencia de enterobacterias aisladas de otro ambiente (*S. Typhimurium* ATCC 14028 y *K. pneumoniae* aislado de un caso de diarrea infantil).

7.2.1. Masas esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol*.

L. plantarum fue inoculada en masas de harina de nixtamal esterilizadas en una concentración de 10^7 UFC/g. A las 24 h de fermentación alcanzó una concentración de 10^9 UFC/g se mantuvieron en este nivel a las 96 h. Se inocularon 10^5 UFC/g de la cepa de *K. pneumoniae* aislada del *pozol*, se alcanzó un crecimiento máximo de 10^8 UFC/g a las 48 h de fermentación para posteriormente disminuir a las 72 h hasta una concentración celular de 10^7 UFC/g. A las 96 h aún se detectó, con una concentración de 10^6 UFC/g. El pH de la masa al inicio de la fermentación fue de 6.2 y disminuyó continuamente hasta un valor de 3.7 para las 96 h. La concentración inicial del ácido láctico fue de 0.4 g/100g y se incrementó durante la fermentación hasta 2.1 g/100 g a las 96 h (Figura 7.5).

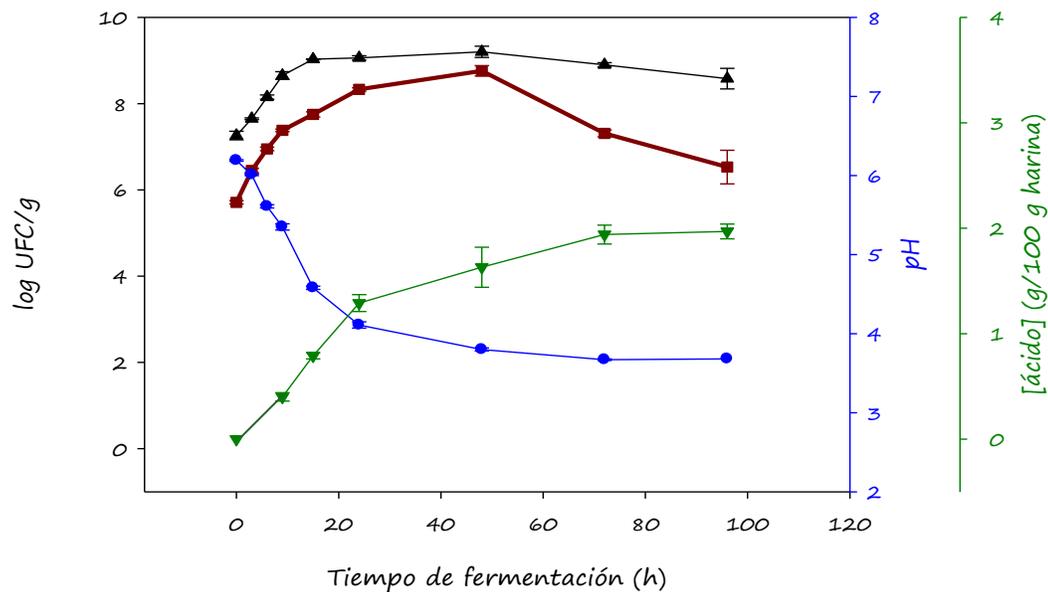


Figura 7.5. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

7.2.2. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso de diarrea infantil.

El lactobacilo se inoculó en una concentración de 10^7 UFC/g, creció durante las primeras 24 h de fermentación hasta 10^9 UFC/g y permaneció constante en esta concentración hasta 96 h. La enterobacteria del caso clínico fue inoculada en una concentración de 10^5 UFC/g y se desarrolló en las primeras 15 h de fermentación a 10^7 UFC/g, después de este punto ocurrió un decremento en la concentración hasta 10^3 UFC/g a las 72 h y a partir de las 96 h ya no se detectó el microorganismo. El pH al inicio de la fermentación fue de 6.2, disminuyó paulatinamente hasta 3.8 para las 48 h y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación. La concentración de ácido láctico se incrementó desde el inicio de 0.3 g/100 g hasta 2.1 g/100g para las 96 h (Figura 7.6).

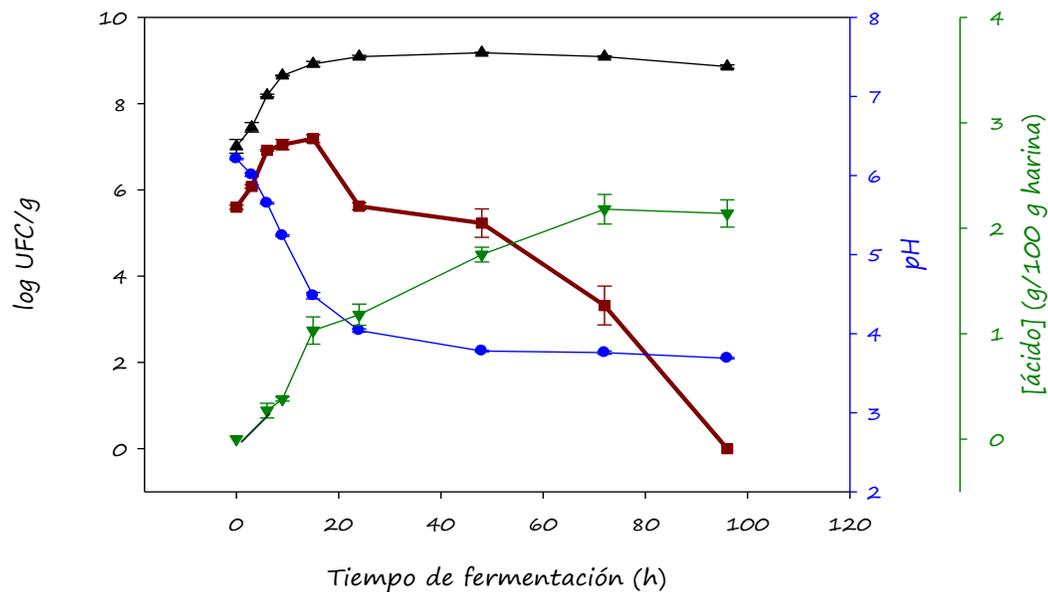


Figura 7.6. Fermentación de masas esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso de diarrea infantil.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

La estabilidad presentada por las diferentes enterobacterias inoculadas en las masas esterilizadas y además inoculadas con la bacteria láctica *L. plantarum* se muestra en la tabla 7.1. Además, para evidenciar las diferencias en el desarrollo se realizó una gráfica con los datos promedio en la concentración celular de las mismas y el pH generado durante las distintas fermentaciones en discusión (Figura 7.7).

En las masas esterilizadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del *pozol*, la enterobacteria se desarrolló desde el inicio hasta niveles altos (10^8 UFC/g) y se observó una ligera disminución a las 48 h cuando la concentración de ácido láctico fue de 1.6 g/100 g de harina y el pH fue de 3.8 (Figura 7.7; Tabla 7.1, condición D). Sin embargo, se detectaron números altos de la enterobacteria a las 96 h (10^6 UFC/g) a pesar de que la concentración de ácido láctico fue de 2.0 g/100 g de harina y el pH generado fue 3.7 (Figura 7.7; Tabla 7.1, condición D). En la tabla 7.1. se indicó, no presentarse la muerte de esta enterobacteria inoculada en las masas esterilizadas, así como la no eliminación.

Por el contrario, en la fermentación con *K. pneumoniae* aislada del caso de diarrea infantil, las enterobacterias solamente se desarrollaron a partir de la concentración inoculada hasta 10^7 UFC/g en un lapso similar (15 h) al presentado por la enterobacteria aislada del *pozol* y cuando la concentración del ácido láctico fue de 1.0 g/100 g y el pH fue de 4.5 empezó la muerte. A las 96 h ya no se detectó el microorganismo, la concentración de ácido láctico fue de 2.1 g/100 g de harina y el pH fue de 3.7 (Figura 7.7; Tabla 7.1, condición E).

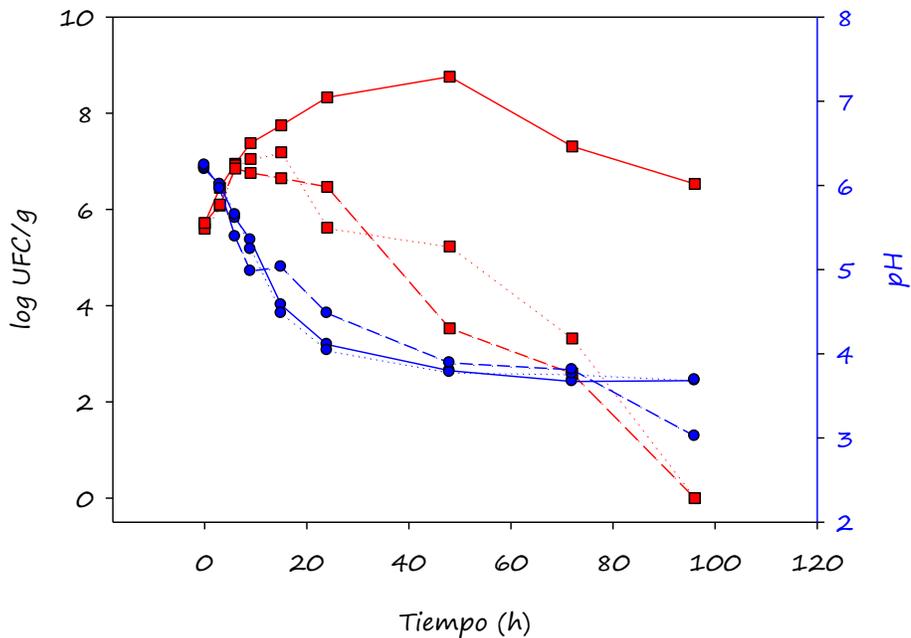


Figura 7.7. Concentración de las enterobacterias respecto a las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación láctica generada por *L. plantarum* Pz-9, en masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Masa esterilizada inoculada con *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol*, concentración de enterobacterias (—■—; línea roja continua) y pH (—●—; línea azul continua); masas esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del caso de diarrea, concentración de enterobacterias (···■···; línea roja punteada) y pH (···●···; línea azul punteada); masas esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028, concentración de enterobacterias inoculadas (---■---; línea roja intermitente) y pH (---●---; línea azul intermitente).

Finalmente, un comportamiento similar se presentó en la fermentación de masas esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica y *Salmonella Typhimurium*. La enterobacteria creció a partir de la concentración inoculada hasta 10^7 UFC/g en un lapso de 24 h y después empieza a morir cuando la concentración de ácido láctico y el pH tiene

valores similares a la fermentación realizada con *K. pneumoniae* aislada del caso clínico. De forma similar a las 96 h ya no se detectaron enterobacterias (Figura 7.7; Tabla 7.1., condición C).

A las 15 o 24 h de fermentación, cuando la concentración de ácido láctico fue 1.0 g/100 g y el pH había disminuído a 4.5, tanto *K. pneumoniae* aislada del caso clínico, como *S. Typhimurium* empiezan a decaer (15 o 24 h), en cambio la enterobacteria aislada del *pozol* aún estaba en fase de crecimiento, y continuó su desarrollo 24 h más. Incluso el microorganismo aislado del *pozol* se detectó a las 96 h, cuando comparativamente ya no existieron células viables de las dos primeras enterobacterias y se había generado 2.1 g/100 g de ácido láctico y el pH descendió a 3.6 (Figura 7.7; Tabla 7.1, condiciones E, C y D, respectivamente).

En la tabla A.II.2 presentada en el Anexo II de este trabajo, se presentan los resultados del análisis estadístico realizado para las fermentaciones que se discuten en esta sección. En las fermentaciones de masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* o *K. pneumoniae* aislado del caso de diarrea infantil el resultado del análisis estadístico indicó que durante las primeras 6 horas de fermentación el desarrollo de las enterobacterias fue similar (Tabla A.II.2; Fermentaciones comparadas C), pues no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas condiciones. Sin embargo, a partir de las 9 h se presentaron diferencias significativas, en el número de células viables. Durante estos tiempos ambas enterobacterias presentaron una disminución en su concentración, siendo menor el número de células viables para *S. Typhimurium*, lo que originó estas diferencias. Al final de la fermentación y ya que ambas enterobacterias para las 96 h ya no estaban viables, no se observaron diferencias significativas en la concentración celular. Lo cual convalidó las observaciones previamente discutidas.

Ahora bien, la prueba de Tukey para cada tiempo en las fermentaciones en masas esterilizadas inoculadas con la bacteria láctica y *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol* contra las fermentaciones en el mismo sustrato y la bacteria láctica pero inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del caso clínico o *S. Typhimurium*, no tuvieron diferencia significativa durante las primeras 6 h de fermentación (Tabla A.II.2; Fermentaciones comparadas A, B y C), se observó que estos tiempos de fermentación corresponden a la fase de crecimiento de las enterobacterias. A partir de las 9 h se obtuvieron diferencias significativas entre las fermentaciones analizadas, para la fermentación inoculada con la enterobacteria aislada del *pozol* a las 9 h aún estaba en fase de crecimiento, en cambio para la fermentación inoculada con la enterobacteria aislada del caso clínico o para la

fermentación inoculada con *S. Typhimurium* se observó una meseta (fase estacionaria en el desarrollo), que continuó hasta las 15 y 24 h para cada caso (Figura 7.7), después de lo cual disminuyen ambas su concentración . La diferencia con respecto a la enterobacteria aislada del *pozol* se debió a que en ésta última la enterobacteria continuó su crecimiento y en números de células viables entre 10^6 y 10^8 UFC/g de masa (Figura 7.7). Estos resultados reforzaron lo discutido en párrafos anteriores respecto a las diferencias en el crecimiento de la enterobacteria aislada del *pozol* y su particular estabilidad a las condiciones antimicrobianas generadas por *L. plantarum* aislado del *pozol* en masas de harina de nixtamal comercial esterilizadas.

En resumen se presentaron las siguientes particularidades al estudiar el efecto antimicrobiano global de la bacteria láctica aislada del *pozol* en la permanencia de las enterobacterias en masas de harina de nixtamal utilizadas en este trabajo:

- a. *Lactobacillus plantarum* en todas las fermentaciones se desarrolló de manera similar. A partir de la concentración inoculada (10^7 UFC/g), se desarrolló en 24 h hasta 10^9 UFC/g y permaneció en estos niveles hasta el final del período de estudio (96 h).
- b. Durante las fermentaciones se detectó únicamente ácido láctico como metabolito generado por las bacterias lácticas desarrolladas. Así mismo se observó la disminución del pH de valores más cercanos a la neutralidad al inicio hasta 3.8 al final de la fermentación.
- c. *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol* sobrevivió a las condiciones antimicrobianas generadas por la bacteria láctica durante la fermentación. Fue posible su detección incluso hasta las 96 h con concentraciones de ácido láctico mayores (2.0 g/100 g) y pH menores (pH=3.6) a las que no pudieron sobrevivir las enterobacterias aisladas de otros ambientes.
- d. Las cepas aisladas de otros ambientes (en particular *K. pneumoniae* aislada de un caso de diarrea infantil), iniciaron su muerte incluso 33 horas antes, con concentraciones de acidez menores (1.0 g/100g) y valores de pH mayores (4.5) y al final de la fermentación no sobrevivieron.

e. En las masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* y/o *K. pneumoniae* aislada del caso clínico, cuando la concentración del ácido láctico fue de 2.31 g/100 g de harina y el pH había disminuido para ambas fermentaciones en general a 3.79, ya no se detectaron enterobacterias.

Esto sugirió que *K. pneumoniae* aislada del *pozol* posee una resistencia mayor al efecto antimicrobiano global generado por *L. plantarum*. En particular se observó que posee mayor resistencia a condiciones de pH bajas. Así mismo, se corroboró que para lograr la muerte de las enterobacterias no aisladas de este alimento empleadas en este estudio, se debe lograr la disminución del pH debido a la producción de ácido láctico a valores menores del pKa de este ácido (3.86). En el caso particular de este estudio concentraciones mayores a 2.31 g de ácido láctico/100 g de masa generarán una disminución por debajo de un pH de 3.79.

La capacidad de las LAB para producir sustancias antimicrobianas se ha empleado históricamente para conservar alimentos. Evidencias considerables demuestran que la fermentación láctica inhibe el desarrollo, sobrevivencia y producción de toxinas de bacterias patogénicas y toxinogénicas (Motarjemi, 2002). Durante la fermentación disminuye la cantidad de carbohidratos disponibles y genera una gama de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana (Ouwehand, 1998). Entre los alimentos donde se efectúa una fermentación láctica y que se ha demostrado la eliminación de microbiota indeseable se encuentran ensilados, productos lácteos fermentados, vegetales fermentados, mezclas de arroz y pescados y mariscos, pescados y carnes fermentados, cereales y leguminosas fermentados y mezclas de ellos con yogurt (Steinkraus, 1997; Lindgren y Dobrogosz, 1990).

En los alimentos tradicionales fermentados de maíz africanos, se ha corroborado el efecto antimicrobiano generado por las bacterias lácticas. Estudios en el *kenkey* (elaborado con granos de maíz limpios y remojados con los cuales se forma una masa y se dejan fermentar por 24 a 48 horas). Una de las bacterias lácticas que contribuye en su mayoría a la fermentación es *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *L. fermentum/reuteri* y *L. brevis*. Se ha observado que el desarrollo de las bacterias lácticas provoca la disminución del pH de 6.0 a 3.7 a las 72 h, debido principalmente a la generación de ácido láctico, acético, butírico y/o propiónico. Estas condiciones originan la disminución de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas a partir de 10^6 UFC/g, sin que sea posible su detección al término de la fermentación (Halm *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1995).

En el caso del *ogi* (elaborado a partir de masa de maíz remojado y fermentado por 1 a 3 días, ingerido como papilla infantil para ganancia de peso), de igual manera una de las principales bacterias lácticas que se desarrolla en la fermentación es *L. plantarum*. Durante esta fermentación los carbohidratos presentes en el almidón hidrolizado se convierten a ácidos orgánicos, lo cual origina el descenso en el pH (Chinyere y Onyekwere, 1996).

Simango y Rukure (1992), realizaron un estudio en el *mahewu* (elaborado a partir del filtrado de masas de maíz hervidos incubados a temperatura ambiente) fermentado (pH 2.74 y 0.5 % de ácido láctico), donde inocularon *Salmonella* sp., *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena y *Shigella* en una concentración de 10^6 y 10^7 UFC/g. Se observó la eliminación de *Salmonella* durante las primeras 4 h de fermentación. En el *mahewu* fermentado no se detectaron ni *Shigella* o *E. coli* enterotoxigénica a las 24 h de estar en el alimento; *E. coli* enteropatógena se detectó en concentración de 10^2 UFC/g. Por lo cual se concluyó que las condiciones generadas durante la fermentación favorecieron la eliminación de grupos de microorganismos indeseables.

Con la aproximación metodológica empleada en el presente estudio únicamente se detectó el ácido láctico como resultado de la inoculación de *L. plantarum* en las masas de maíz nixtamalizado, y para las masas de maíz nixtamalizado sin esterilizar inoculadas con la misma bacteria, el ácido acético. De acuerdo a la taxonomía filogenética *L. plantarum* es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa perteneciente al Grupo 2 de los lactobacilos que incluye a aquéllos que fermentan hexosas a ácido láctico y pueden producir gas del gluconato pero no a partir de la glucosa. Se emplea como cultivo iniciador en productos de cereales fermentados y forma parte de los microorganismos que se desarrollan en vegetales fermentados (Felis y Dellaglio, 2007).

Cuando se analizó la biodiversidad por DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturante) de muestras de *poto-poto*, *ogi* y *pozol*, Ampe y Miambi (2000), encontraron que este microorganismo (*L. plantarum*), se encuentra distribuido en estos alimentos además de *L. fermentum*, y *L. delbrueckii*. La ubicuidad de estos microorganismos en los distintos productos analizados sugiere su importancia en la fermentación del maíz. Así mismo, además de la producción de ácido láctico puede producir bajo ciertas condiciones de ácido acético, diacetilo, acetoína y butanediol (Ouweland, 1998; Lindgren *et al.*, 1990). Se ha detectado además, que algunas cepas de *L. plantarum* tienen la capacidad de producir ácido feniláctico y/o ácido p-OH-feniláctico, empleados como antimicrobianos para evitar el desarrollo de microorganismos indeseables en pan como *Bacillus subtilis*, la generación de estos metabolitos provocan la disminución en el pH a valores entre 3.3 y 3.4 (Valerio *et al.*, 2008).

Otros antimicrobianos reportados en la literatura que pueden producir cepas de este microorganismo son las bacteriocinas de clase II denominadas plantaricinas (plantaricina A, plantaricina C, plantaricina S y plantaricina T), que poseen actividad antimicrobiana contra diversas especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* y *Clostridium*. (Cotter *et al.*, 2005; Caplice y Fitzgerald, 1999; Ouwehand, 1998).

Los resultados de los parámetros evaluados en el modelo de fermentación en masas de harina de maíz nixtamalizado obtenidos en este estudio con los grupos microbianos seleccionados son consistentes a los encontrados en estudios anteriores. Nuraida *et al.* (1995), analizaron la microbiota de *pozol* de Chiapas y observaron que las bacterias lácticas se desarrollaron después de 0.5 días (d), 2 d y 6 d tuvieron una concentración de 10^7 a 10^8 UFC/g de bacterias lácticas. Las especies de bacterias lácticas predominantes fueron *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. confusus*, *L. lactis* y *L. raffinolactis*. Los niveles de bacterias lácticas en el interior y superficie de la bola de *pozol* fue similar a los 6 d de fermentación. El pH a los 0.5 d de fermentación osciló entre 4.0 y 4.7, sin embargo a los 6 días el pH fue ligeramente menor en el interior (3.7) que en la superficie (4.2). Las concentraciones de ácido láctico determinados por acidez titulable a los 7 o 9 días oscilaron entre 0.35% (*pozol* tradicional) a 0.75% (*pozol* mestizo). En el presente estudio para las fermentaciones de masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas e inoculadas con *L. plantarum*, se obtuvo el desarrollo de la bacteria láctica, el descenso del pH y un % de acidez en valores similares a lo descrito por estos autores.

En estudios previos se observó el comportamiento de las bacterias lácticas y de las enterobacterias durante la fermentación del *pozol*. Wachter *et al.* (2000), encontraron que en las masas de *pozol* de San Cristobal de las Casas, Chiapas presentaron concentraciones similares en *pozol* mestizo y tradicional (10^5 a 10^6 UFC/g) al inicio de la fermentación y un incremento a las 48 h de 10^8 a 10^9 UFC/g. El pH disminuyó a partir de 6.9 a 4.4 y 4.6 para ambos tipos de muestras. A pesar de las condiciones de pH generadas en la fermentación, los autores no observaron la eliminación de grupos indeseables como las enterobacterias, las cuales a partir de la concentración inicial (10^4 UFC/g) a las 48 h de fermentación se observó un incremento a 10^5 UFC/g).

Con una aproximación polifásica Ben Omar *et al.* (2000), encontraron resultados similares, el monitoreo de una fermentación de *pozol* de Villahermosa, Tab., durante 4 días indicó que la concentración de bacterias lácticas

viabiles se incrementó a 10^9 a 10^{10} UFC/g, siendo 5 veces mayor en la periferia de las bolas de *pozol* en comparación con el centro. Así mismo, encontraron un aumento en la concentración de enterobacterias por medio de la cuenta de viabiles o mediante sondas de hibridación para RNAr de 10^8 UFC/g en la periferia en comparación con el centro de la bola donde se obtuvieron 10^4 UFC/g. Se observó que al inicio de la fermentación los grupos de bacterias lácticas predominantes fueron heterofermentativos (primeras 48 h), y fueron sustituidas paulatinamente por los grupos homofermentativos, entre los cuales predominaron especies de *L. plantarum*, *L. casei* y *L. delbrueckii*. El pH determinado fue de 5.8 al inicio de la fermentación y disminuyó hasta menos de 4.0 en el centro de las bolas mientras se obtuvieron valores de 4.5 en la periferia. La concentración de ácido láctico se incrementó hasta 150 a 200 mM (1.35% a 1.8%). Los niveles de pH y la concentración de ácido láctico generada alcanzados en las fermentaciones inoculadas con *L. plantarum* fueron similares a los estudios realizados por estos autores.

De nuevo, el modelo que se empleó en el presente trabajo al utilizar masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas no generó diferencia en el comportamiento de los grupos microbianos inoculados aislados del *pozol*. *L. plantarum* fue consistente con lo encontrado por estudios anteriores, la bacteria láctica en el modelo empleado en nuestro estudio desarrolló de manera similar y durante la fermentación se generaron condiciones de acidez similares. Además, cuando se inoculó la enterobacteria aislada del *pozol* presentó el mismo comportamiento en el desarrollo a lo largo de la fermentación a lo encontrado en los estudios citados.

Resalta en los resultados obtenidos en la investigación, que en cepas de enterobacterias no nativas del *pozol* (*Salmonella* Typhimurium y *Klebsiella pneumoniae* aislada del caso clínico), las condiciones antimicrobianas generadas durante la fermentación láctica favorecieron su eliminación, lo cual corrobora el comportamiento que muestran todos los microorganismos indeseables en otros alimentos fermentados, cuando se favorecen las condiciones adecuadas. Como se mencionó en párrafos anteriores, en el caso de los alimentos fermentados de maíz africanos se generan un descenso en el pH después de 24 o 48 h entre 3 y 4. En contraparte la enterobacteria aislada del *pozol* no se ve afectada al verse expuesta bajo las mismas condiciones antimicrobianas de acidificación, y esto favoreció la permanencia de las enterobacterias aisladas del *pozol*.

7.3. Efecto antimicrobiano del ácido láctico en la sobrevivencia de las enterobacterias del *pozol* en suspensiones de harina de nixtamal.

En las secciones anteriores se observó que al inocular *L. plantarum* y alguna de las enterobacterias en masas esterilizadas, el principal metabolito detectado durante las fermentaciones fue el ácido láctico. Para estudiar el efecto aislado del ácido láctico como antimicrobiano en el desarrollo de las enterobacterias, se evaluó la permanencia de las enterobacterias en suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas, frente a concentraciones del ácido similares a las generadas por la bacteria láctica.

7.3.1. Suspensiones inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y agitadas a 100 r.p.m.

Esta fermentación se realizó como control para determinar la concentración de ácido láctico que se genera al inocular ambos microorganismos en las suspensiones. La bacteria láctica se inoculó en una concentración de 10^7 UFC/mL, se desarrolló al máximo a las 24 h a 10^9 UFC/mL, y permaneció así hasta las 96 h. *S. Typhimurium* se inoculó en un orden de 10^5 UFC/mL y se desarrolló al máximo a las 24 h de fermentación a 10^7 UFC/mL. Después de este punto decreció la concentración de la enterobacteria drásticamente, de manera que a las 48 h se detectaron 10^3 UFC/mL y en los siguientes muestreos ya no se detectó el microorganismo (Figura 7.8).

La concentración de ácido láctico se incrementó desde el inicio y para las 96 h la concentración fue de 1.4 g/100 g. También se detectó ácido acético a partir de las 48 h de fermentación con un valor de 0.4 g/100 g, y a las 96 h la concentración del ácido fue 0.6 g/100 g. El pH de la fermentación al inicio fue de 7.0, disminuyó continuamente hasta 3.8 a las 96 h (Figura 7.8).

De acuerdo a las concentraciones obtenidas durante el desarrollo de la fermentación se obtuvo un comportamiento similar a lo ocurrido en masas inoculadas con ambos microorganismos. Sin embargo, se generó el ácido acético (el cual no se detectó en masas), además de ácido láctico. Se ha mencionado con anterioridad que *L. plantarum* es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa, cuyo producto principal de fermentación es el ácido láctico. Cuando se desarrolla bajo condiciones aeróbicas, se produce ácido acético

además del ácido láctico. Ya que las fermentaciones de suspensiones de nixtamal se realizaron con agitación, se favoreció la aireación del sustrato. Se ha encontrado que el ácido láctico se produce primordialmente al inicio, y cuando la fuente de carbohidrato casi se ha agotado se genera el ácido acético, la enzima implicada en este metabolismo aeróbico es la piruvato oxidasa, cuya actividad se incrementa en presencia de oxígeno y se reduce en presencia de glucosa. La actividad específica de la enzima es máxima durante el inicio de la fase estacionaria (Sedewitx *et al.*, 1984).

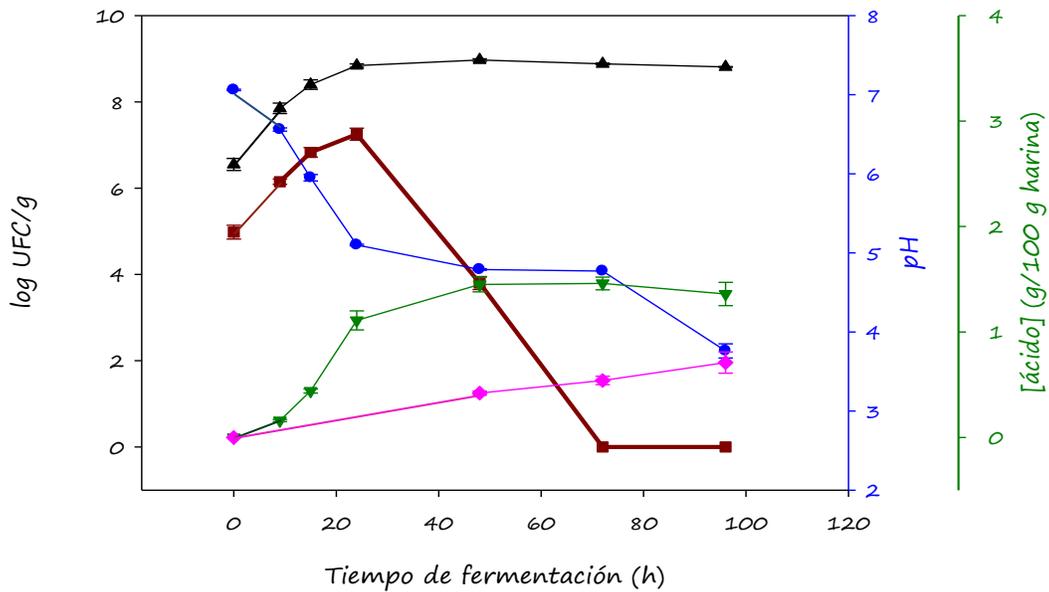


Figura 7.8. Fermentación de suspensiones esterilizadas inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ / 100 r.p.m. Concentración de bacterias lácticas (-▲-), enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-), ácido acético (-◆-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Durante la fermentación realizada, se observó que la mayor concentración de ácido acético se generó durante la fase estacionaria (Figura 7.8). La expresión del RNAm *poxB* que codifica para la piruvato oxidasa, se observó que se induce fuertemente por efecto de la aireación y se reprime por glucosa, así mismo se observó que la expresión es máxima en la fase estacionaria temprana cuando la glucosa se agotó (Lorquet *et al.*, 2004). Charalampopoulos *et al.* (2002), inocularon una cepa de *L. plantarum* en medio líquido natural de malta sin agitar a 37°C y observaron la producción de ácido láctico (1.99 g/L a las 12 h y 5.74 g/L a las 48 h) y de ácido acético (0.29 g/L a las 12 h y 0.32 g/L a las 12 y 48 h), lo cual indica que inclusive en medios naturales líquidos sin

agitar es posible la generación del ácido acético además del producto principal del catabolismo de carbohidratos.

Algunos ácidos generados durante la fermentación pudieron ser producidos también por *Salmonella* Typhimurium, se conoce que este microorganismo así como otras bacterias entéricas emplean tres sistemas enzimáticos distintos que actúan sobre el piruvato bajo condiciones fermentativas (fermentación ácido-mixta) (Madigan y Martinko, 2006). En estudios de proteómica realizados en este microorganismo se detectaron las enzimas que se sintetizan en condiciones anaeróbicas. Las enzimas detectadas fueron la piruvato formato liasa, lactato deshidrogenasa y α -acetolactato sintasa. Como parte de esta última enzima, la enzima acetato cinasa (AckA) convierte acetilfosfato a acetato y la reacción está acoplada a la síntesis de ATP. La AckA se incrementa en condiciones anaerobias (Encheva *et al.*, 2009).

7.3.2. Suspensiones esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol y agitadas a 100 r.p.m.

Esta fermentación se realizó como un control para conocer si *K. pneumoniae* aislada del pozol era capaz de producir ácido láctico y cuantificarlo. Se adicionó la enterobacteria en una concentración de 10^5 UFC/mL; se desarrolló al máximo a las 24 h de fermentación a 10^9 UFC/mL, y permaneció en estos niveles hasta las 96 h (Figura 7.9).

El pH de la fermentación al inicio fue 6.2 y disminuyó continuamente hasta las 72 h a 5.2, se mantuvo constante hasta las 96 h. El ácido láctico se detectó en una concentración aproximada de 0.2 g/100 g, manteniéndose constante durante todo el tiempo. Así mismo se detectó ácido acético el cual se incrementó durante la fermentación hasta una concentración de 0.3 g/100 g a las 48 h permaneció así hasta las 72 h. A las 96 h la concentración detectada fue de 0.4 g/100 g (Figura 7.9). También se detectaron otros compuestos en los cromatogramas obtenidos por HPLC, que coincidieron con los tiempos de retención del butanediol y acetoína.

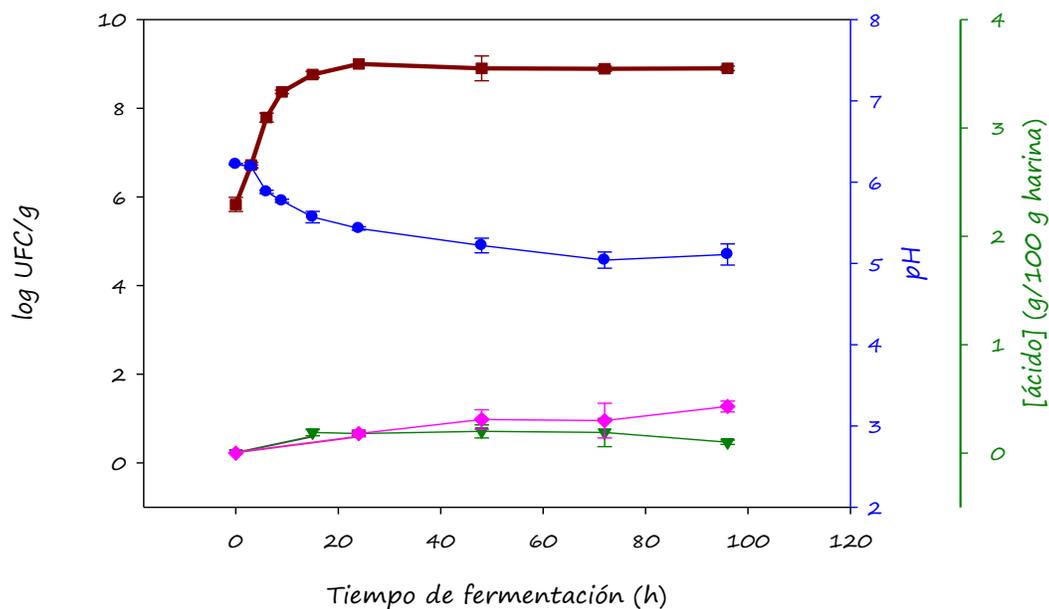


Figura 7.9. Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ / 100 r.p.m. Concentración de enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-), ácido acético (-◆-) y pH (-●-). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Klebsiella pneumoniae genera el 2,3-butanediol por la vía de la fermentación de ácidos-mixtos. Los productos finales de la vía incluyen etanol, acetato, lactato, formato y succinato. A partir del 2,3-butandediol se puede generar acetoína (también conocida como acetilmetilcarbinol). La conversión metabólica de acetoína a 2,3-butanediol es reversible y es catalizada por la enzima acetoínreductasa. Así mismo, el diacetilo puede ser convertido a acetoína mediante una reacción irreversible. En *K. pneumoniae* y otros microorganismos productores de diacetilo, la diacetil (acetoin) reductasa cataliza la reducción reversible de acetoína y la oxidación del NADH a 2,3-butanediol (Madigan y Martinko, 2006).

En cultivos de crecimiento lento en quimiostato, *K. pneumoniae* (*K. aerogenes*) fermenta la glucosa completamente a acetato y etanol (mas formiato y CO_2); bajo estas condiciones al proporcionar pulsos de glucosa, ésta se consume rápidamente, el exceso se fermenta a lactato sin la formación neta de ATP. La formación de acetato es energéticamente mas favorable que la síntesis de 2,3-butanediol, pero tiene un efecto en el balance redox de la reacción (un producto final reducido –etanol o succinato- debe formarse para mantener el balance redox), una ramal de la fermentación permite algo de variación en la relación entre la

velocidad de catabolismo y la velocidad de formación de ATP, dependiendo de las circunstancias lo requieran (Teixeira de Mattos *et al.*, 1984).

Para la producción de 2,3-butanediol se han empleado mazorcas de maíz, almidón de maíz, sacarosa, maltosa, lactosa, xilosas, galactosa, glucosa, fructosa, manosa y arabinosa (Wang *et al.*, 2010). Algunos de estos carbohidratos se han detectado en las masas de *pozol* (Santillana, 1995; Díaz-Ruíz, 2003). La velocidad de transferencia de oxígeno es un factor importante que afecta la concentración del butanediol, se ha demostrado que cuando la cantidad de oxígeno es limitada se favorece la acumulación de ácido acético, así mismo si el oxígeno se limita posteriormente se observa la acumulación de acetoína, 2,3-butanediol, etanol y ácido láctico. En *K. pneumoniae* se ha observado que la disminución de pH favorece la disminución de ácido acético incrementándose la acumulación de 2,3-butanediol (Syu, 2001; Petrof y Petrova, 2010; Wang *et al.*, 2010). Por lo tanto, la detección del butanediol y acetoína se debió a la fermentación ácido-mixta generada por la cepa aislada del *pozol* a partir de carbohidratos presentes en la suspensión de harina de maíz nixtamalizado y se favoreció por la disminución de pH. Se pudo observar que la cepa empleada resiste las condiciones de acidez generadas por su propio metabolismo y que en parte los metabolitos ácidos generados en las suspensiones se deben a la enterobacteria inoculada.

7.3.3. Suspensiones esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol*, agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.

Se adicionaron al sustrato concentraciones equivalentes de ácido láctico a las producidas en una fermentación efectuada en masas de harina de nixtamal, inoculadas con *Lactobacillus plantarum* y la misma enterobacteria (Inciso 7.2.1). En la Tabla 6.1. (Inciso 6.5.2), correspondiente al capítulo de materiales y métodos se muestran las concentraciones de ácido láctico adicionadas en cada tiempo de fermentación.

La enterobacteria fue inoculada inicialmente con una concentración de 10^5 UFC/mL y se desarrolló hasta 10^8 UFC/g en las primeras 15 h. Posteriormente disminuyó la cuenta, aunque se mantuvo viable durante el transcurso de la fermentación. A las 96 h la concentración de *K. pneumoniae* aislada del *pozol* en la suspensión fue de 10^5 UFC/g, para este tiempo se detectaron concentraciones de ácido láctico de 1.79 g/100 g, así como

butanediol. El pH inicial en la suspensión fue de 6.3 y disminuyó continuamente hasta 3.1 a las 96 h (Figura 7.10).

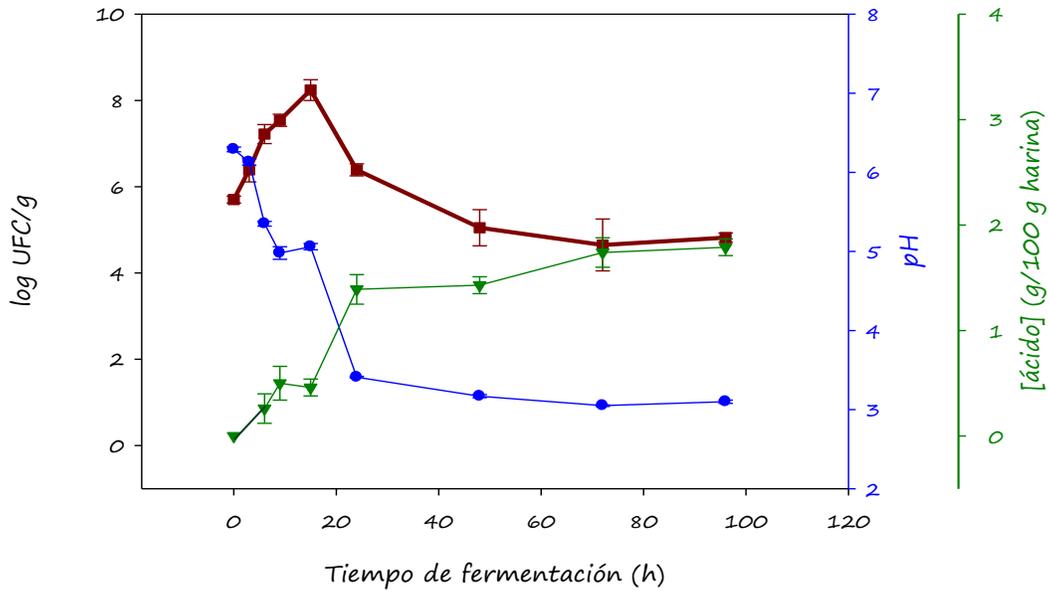


Figura 7.10. Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol con adición externa de ácido láctico.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ / 100 r.p.m. Concentración de enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (●). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

7.3.4. Suspensiones esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso de diarrea infantil, agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.

Se adicionaron concentraciones equivalentes de ácido láctico a las generadas en una fermentación efectuada en masas de harina de nixtamal, inoculadas con *Lactobacillus plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del pozol (Inciso 7.2.1).

La enterobacteria aislada del caso diarreico se inoculó al inicio en una concentración de 10^5 UFC/mL y tuvo su máximo desarrollo a las 15 h de fermentación con una concentración de 10^7 UFC/mL, después inició la muerte del microorganismo y a las 24 h fue 10^5 UFC/mL. A partir de las 48 h no se detectaron células viables. La concentración de ácido láctico detectada fue ligeramente menor que la adicionada de 1.73 g/100 g a las 96 h. El pH de la suspensión al inicio fue 6.2, disminuyó y a las 96 h fue de 3.0 (Figura 7.11).

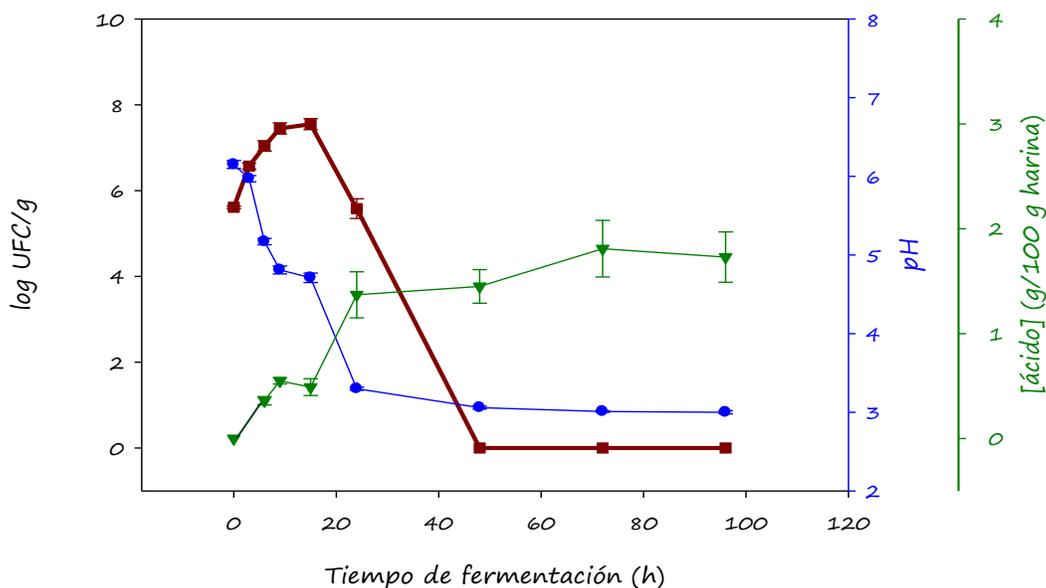


Figura 7.11. Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada de un caso de diarrea infantil con adición externa de ácido láctico

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ / 100 r.p.m. Concentración de enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (●). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

7.3.5. Suspensiones esterilizadas inoculadas con *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, agitadas a 100 r.p.m., con adición de ácido láctico.

Con el fin de determinar el efecto del ácido láctico, se adicionaron al sustrato concentraciones equivalentes de este ácido a las que se produjeron en una fermentación efectuada en suspensiones de harina de nixtamal, agitadas e inoculadas con *Lactobacillus plantarum* y la misma enterobacteria (Inciso 7.3.1). Las concentraciones del ácido láctico que se adicionaron se mostraron en la tabla 6.2 (Inciso 6.5.2), incluido en el capítulo de materiales y métodos.

La enterobacteria se inoculó en las suspensiones en una concentración de 10^5 UFC/mL, se desarrolló al máximo en 15 h a 10^7 UFC/mL y después de este tiempo la concentración empezó a declinar. A las 48 h se cuantificaron 10^6 UFC/mL del microorganismo y a partir de las 72 h ya no se detectó. La concentración de ácido láctico se detectó en concentraciones menores a las adicionadas, alcanzando un valor de 1.3 g/100 g a las 96 h. El pH descendió desde el inicio a partir de 7.1 hasta 4.1 (Figura 7.12).

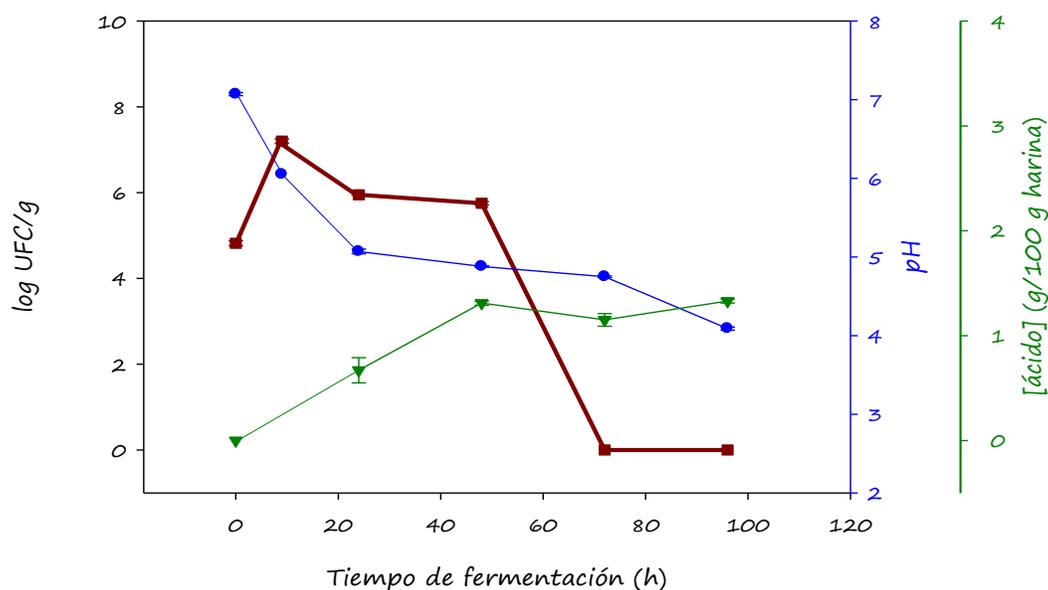


Figura 7.12. Fermentación de suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 con adición externa de ácido láctico.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ / 100 r.p.m. Concentración de enterobacterias inoculadas (-■-), ácido láctico (-▼-) y pH (●). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

En la tabla 7.2 se presentan las diferencias en la sobrevivencia de las diferentes enterobacterias inoculadas en las suspensiones de harina de nixtamal al 20% (P/V), agitadas y sometidas a las concentraciones equivalentes del ácido láctico. Se resaltan únicamente las concentraciones de ácido láctico y pH cuantificados cuando se inicia la muerte de las enterobacterias mencionadas en la tabla, así como la cuantificación de ambos parámetros cuando ya no se observaron Unidades Formadoras de Colonias en las muestras. En la gráfica 7.13 se compara el desarrollo promedio que presentaron las tres enterobacterias al ponerse en contacto con la concentración equivalente del ácido láctico generado en la fermentación láctica, así como el pH.

Al haber adicionado la concentración de ácido láctico en las suspensiones esterilizadas, agitadas e inoculadas con la enterobacteria aislada del *pozol*, ésta se desarrolló a partir de la concentración inoculada hasta las 15 h a 10^8 UFC/mL, cuando la concentración de ácido agregada fue de 0.5 g/100 g y el pH había disminuido a 5.1. Posteriormente, las cuentas del microorganismo disminuyeron, pero a pesar de que la concentración de ácido láctico añadida fue de 1.8 g/100 g y el pH había descendido hasta 3.1 (Figura 7.13, Tabla 7.2, condición A), la enterobacteria del *pozol* permaneció durante toda la fermentación, teniendo a las 96 h incluso 10^5 UFC/mL.

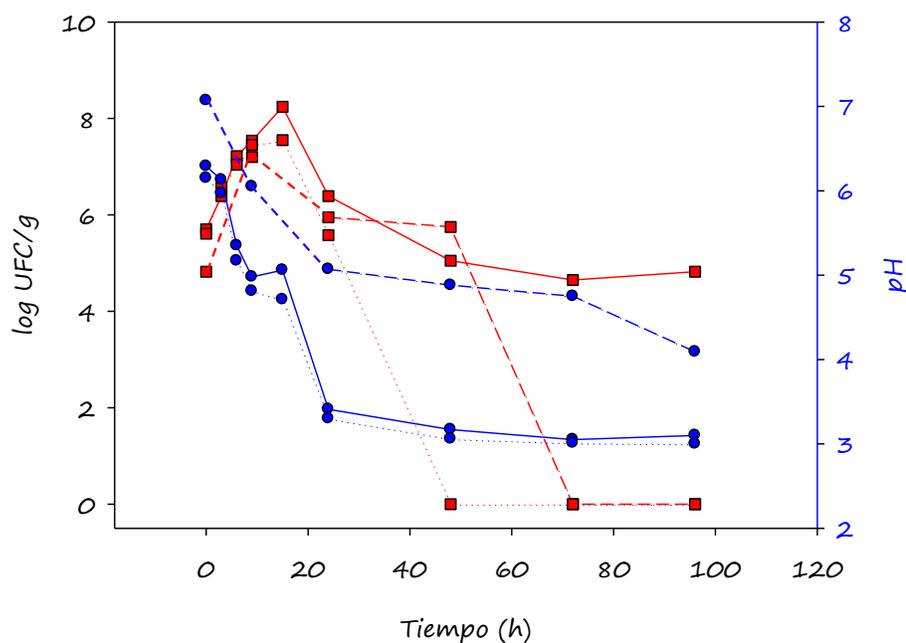


Figura 7.13. Desarrollo de enterobacterias respecto a la concentración equivalente de ácido láctico producido durante la fermentación láctica en suspensiones de harina de maíz nixtamalizado esterilizado.

Incubadas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ y agitadas a 100 r.p.m. Suspensiones esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol*, concentración de enterobacterias (—■—; línea roja continua) y pH (—●—; línea azul continua); suspensiones esterilizadas inoculadas con *Klebsiella pneumoniae* aislada del caso de diarrea, concentración de enterobacterias (····■····; línea roja punteada) y pH (····●····; línea azul punteada); suspensiones esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028, concentración de enterobacterias inoculadas (---■---; línea roja intermitente) y pH (---●---; línea azul intermitente).

Cuando a la enterobacteria aislada del caso clínico se le adicionó la concentración del ácido láctico, ésta se desarrolló en 15 h hasta 10^7 UFC/mL (Figura 7.13), y a partir de este tiempo inició su muerte, para este tiempo ya se habían adicionado 0.5 g/100 g de ácido láctico y el pH había descendido a 4.7 (Tabla 7.2, condición B). A partir de las 48 h de fermentación ya no se detectó el microorganismo (Figura 7.13). Para este tiempo la concentración del ácido láctico adicionada fue 1.5 g/100 g y el pH 3.1 (Tabla 7.2, condición B).

Así mismo, *S. Typhimurium* se desarrolló en 15 h a partir de la concentración inoculada a 10^7 UFC/mL y después de este tiempo inició su muerte (Figura 7.13). En este tiempo la concentración del ácido láctico añadida fue de 0.4 g/100 g y el pH fue 5.3 (Tabla 7.2, condición C). A las 72 h cuando se habían adicionado 1.5 g/100 g del ácido y el pH fue de 4.8 ya no se detectó el microorganismo.

Las tres enterobacterias mostraron un comportamiento similar al inicio de la fermentación con respecto a la adición del ácido láctico, en los tres casos se desarrollaron a partir de la concentración inoculada, en el mismo lapso de tiempo (15 h), *S. Typhimurium* y *K. pneumoniae* aislada del caso clínico se desarrollaron en niveles similares (10^7 UFC/mL), en cambio la *K. pneumoniae* aislada del *pozol* creció un poco más (10^8 UFC/mL) (Figura 7.13). De igual forma, cuando se habían adicionado concentraciones de ácido láctico semejantes (0.4 a 0.5 g/100 g) empezaron a decrecer.

El microorganismo aislado del *pozol*, a pesar de haber disminuído ligeramente en las cuentas de bacterias no se eliminó durante el resto de la fermentación. Inclusive a las 48 h cuando ya no se detectó la enterobacteria aislada del caso clínico, las cuentas de *K. pneumoniae* aislado del *pozol* fueron de 10^5 UFC/mL (Figura 7.13), a pesar de que la concentración del ácido adicionada era 1.4 g/100 g y el pH había disminuído a 3.2 (Tabla 7.2, condiciones A vs. B). Para las 96 h aún se mantuvo en fase estacionaria (Figura 7.13), no obstante haberse agregado 1.8 g/100 g del ácido (Tabla 7.2, condición A).

Un patrón similar se observó al comparar la sobrevivencia de la enterobacteria aislada del *pozol* frente a *S. Typhimurium*. La segunda inició su muerte después de haberse agregado 0.4 g/100 g del ácido (15 h). A las 72 h ya no se detectó *S. Typhimurium* (Figura 7.13), cuando la concentración agregada del ácido fue 1.2 g/100 g y el pH fue 4.8 (Tabla 7.2, condición C). Sin embargo, la enterobacteria del *pozol* para este tiempo aún se mantenía en cuentas de 10^5 UFC/mL (Figura 7.13), a pesar de que se había agregado una mayor concentración del ácido (1.7 g/100 g) y el pH fue menor (3.1) (Figura 7.13).

De acuerdo con lo anterior, se puede resumir lo siguiente al evaluar la sobrevivencia de las enterobacterias en suspensiones de harina de nixtamal:

- a. La concentración equivalente del ácido láctico adicionado afectó ligeramente la viabilidad de la enterobacteria aislada del *pozol*. Sin embargo, ésta presentó una mayor resistencia al mismo, logrando su permanencia a lo largo del tiempo evaluado.

Tabla 7.2. Variaciones en la concentración de ácido láctico y pH durante la evaluación de la permanencia y/o eliminación de enterobacterias en fermentaciones de suspensiones de harina de nixtamal al 20% (P/V) esterilizadas y agitadas a 100 r.p.m., con adición externa de ácido láctico.

Se destaca entre paréntesis el tiempo en que se detectaron la concentración del ácido láctico y el pH.

CONDICIÓN	SUSTRATO	INÓCULO	INICIO MUERTE (15 h)		NO DETECCIÓN	
			[ácido láctico] (g/100 g)	pH	[ácido láctico] (g/100 g)	pH
A	Suspensiones	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pozol	0.46	5.1	No eliminación ^a	No eliminación ^a
B	Suspensiones	<i>Klebsiella pneumoniae</i> clínico	0.49	4.7	1.45 (48 h)	3.1 (48 h)
C	Suspensiones	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0.44	5.5	1.15 (72 h)	4.8 (72 h)

a. A las 96 h la concentración del ácido láctico detectado fue 1.79 y el pH fue 3.1. La concentración de la enterobacteria a las 96 h fue de 10^5 UFC/mL.

- b. Esta concentración equivalente del ácido láctico afecta la viabilidad y presencia de las enterobacterias aisladas de otra fuente. En general después de 15 h de fermentación se inicia la eliminación de las mismas, ésta ocurrió a las 48 o 72 h de estar en contacto con el ácido láctico.

La prueba de comparación múltiple de Tukey en el ANOVA aplicado para las fermentaciones en suspensiones de harina de nixtamal adicionadas con ácido láctico inoculadas con la *K. pneumoniae* aislada del *pozol* en comparación con *K. pneumoniae* aislada del caso de diarrea infantil (Tabla A.II.3; Fermentación comparada A), indicó que no hubo diferencia significativa sino hasta las 9 h, esto es consistente con lo discutido en los párrafos anteriores, a pesar de ser del mismo género y especie pero de diferente origen y hábitat tuvo un desarrollo similar hasta las 9 h de fermentación, ya que ambas se encuentran en fase de crecimiento (Figura 7.13). A partir de las 15 h se obtuvieron diferencias significativas entre ambas condiciones comparadas puesto que la enterobacteria aislada del *pozol* continuó su desarrollo hasta las 15 h y después disminuye el número de colonias viables pero no se eliminaron. En cambio en la enterobacteria aislada del caso diarreico a las 9 h presentó su máximo desarrollo que se mantuvo hasta las 15 h en la misma concentración, y después disminuyó drásticamente en el número de colonias viables.

Al comparar el desarrollo de la enterobacteria aislada del *pozol* con el desarrollo de *S. Typhimurium* ATCC 14028 al adicionar el ácido láctico en las suspensiones de harina de nixtamal, indicó desde el inicio de las fermentaciones diferencias significativas (Tabla A.II.3; Fermentación comparada B), a pesar de que *S. Typhimurium* también tiene su tiempo máximo de desarrollo a las 15 h, la concentración de colonias es menor en comparación con la *K. pneumoniae* aislada del *pozol*. Como se mencionó previamente la primera inicia su muerte después de este tiempo y a las 72 h ya no se detectó (Figura 7.13). También *K. pneumoniae* aislada del alimento fermentado disminuye a partir de su desarrollo máximo pero no se eliminan las colonias viables a pesar de haber adicionado una concentración similar de ácido láctico y generado condiciones de pH similares.

Por último el análisis estadístico realizado para evaluar las diferencias en el desarrollo de *K. pneumoniae* aislado del caso clínico y *S. Typhimurium* ATCC 14028, en las fermentaciones con el mismo tipo de sustrato y adición de ácido láctico, indicó que existen diferencias significativas durante las fases de crecimiento (Figura 7.13). Ambas disminuyeron su concentración celular a partir de este tiempo. Las concentraciones celulares durante el resto de

los puntos evaluados fueron en general similares y no se presentaron diferencias significativas. Por lo cual los resultados del análisis estadístico fué consistente con las observaciones discutidas para estas condiciones.

La concentración de las enterobacterias frente al ácido láctico en las fermentaciones en suspensiones esterilizadas y agitadas, se asemejó al mostrado en las fermentaciones en masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y cada una de las enterobacterias, discutidas en los incisos respectivos (Incisos 7.1.3, 7.2.1 y 7.2.2).

En masas esterilizadas, tanto de *K. pneumoniae* aislada del caso clínico como *S. Typhimurium* ATCC 14028 crecieron hasta 10^7 UFC/g en un periodo de 15 o 24 h y después empiezan a declinar. Lo anterior es similar a las concentraciones y período de desarrollo presentado en las suspensiones con adición del ácido láctico.

Sin embargo, en esas fermentaciones ambas enterobacterias pudieron permanecer por más tiempo pues hasta las 96 h ya no se detectaron. Probablemente, la naturaleza semisólida del sustrato contribuyó a una lenta difusión del ácido que genera la bacteria láctica, lo cual favoreció una eliminación mas tardía. En las suspensiones, la eliminación se presenta en menor tiempo debido a la homogenización lograda durante la agitación y a la naturaleza líquida del sustrato.

Así mismo *K. pneumoniae* aislada del *pozol* al ser inoculada con *L. plantarum* en masas esterilizadas, se desarrolló mejor que las otras enterobacterias, lo cual también se presentó al ser inoculada en las suspensiones con la adición del ácido láctico. Incluso en las masas su fase de crecimiento duró mas tiempo (48 h) y aunque disminuyó la concentración de microorganismos a partir de este tiempo para las 96 h aún permaneció en números altos y similares al presentado en las suspensiones (10^5 UFC/ g o mL).

Lo anterior indica que la permanencia que presenta la enterobacteria aislada del *pozol* se debe a que se encuentra adaptada a las concentraciones del ácido láctico y pH que se generan durante la fermentación láctica al desarrollarse las bacterias lácticas presentes en el mismo.

Los resultados mostrados en el presente trabajo muestran que la enterobacteria aislada del alimento e inoculada en las suspensiones de harina de maíz nixtamalizados, se encuentra adaptada a las condiciones de acidez debido al origen natural de la misma. Wachter (1995), encontró la introducción de los grupos microbianos ocurre durante la molienda de los granos de maíz nixtamalizado para elaborar el *pozol* de San Cristobal de las Casas, Chiapas. En el molino entonces se encuentran presentes los microorganismos adaptados a las condiciones ácidas, entre ellos la cepa de *K. pneumoniae* aislada del *pozol* y empleada en este estudio.

Ostling y Lindgren (1993), evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) del ácido láctico y ácido acético y ácido formico sin disociar sobre 23 especies de enterobacterias (como *Enterobacter agglomerans*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *Hafnia alvei*), y dos cepas de *Listeria monocytogenes*. Los autores demostraron que el ácido láctico sin disociar fue entre dos a cinco veces mas eficiente en la inhibición de *L. monocytogenes* que con las enterobacterias, en tanto que el ácido acético no disociado mostró la misma inhibición entre los grupos susceptibles. Estos estudios se realizaron en valores de pH entre 4.2 y 5.4.

En las suspensiones de harina de maíz nixtamalizadas inoculadas con las diferentes enterobacterias el pH disminuyó entre 3.0 y 4.0. Bajo estas condiciones el ácido láctico se encontraba en su forma no disociada debido ya que el pKa de este ácido es 3.9, con lo cual ejerció su efecto antimicrobiano en las enterobacterias de origen distinto al del *pozol*.

En papillas de maíz fermentadas y sin fermentar, utilizadas como alimentos para ganancia en peso entre la población infantil, se inocularon cepas de *Shigella flexneri* adaptada a condiciones de acidez y sin adaptar y se observó que las cepas adaptadas a estas condiciones se mantuvieron en niveles mayores en comparación con las cepas no adaptadas al ácido. Los resultados indicaron que una exposición previa a estrés ácido origina una mayor resistencia a condiciones de acidez subsecuentes (Tetteh *et al.*, 2004).

Ya que el pH es un factor importante para el crecimiento, sobrevivencia e infección de bacterias patógenas, éstas han desarrollado numerosas estrategias para la adaptación al pH ácido externo. La resistencia al ácido es importante en bacterias patogénicas que se desarrollan bajo el fuerte estrés ácido encontrado en el estómago de mamíferos y los fagosomas ácidos. Se ha propuesto que *E. coli* despliega un alto grado de inducción de resistencia al ácido a través de un mecanismo dependiente de aminoácidos que requiere respectivamente

glutamato, lisina o arginina descarboxilasas con los antiportadores afines glutamato/c-aminobutirato, lisin/cadaverin o arginin/agmatina (Bi *et al.*, 2009).

En el caso particular de *Salmonella*, se ha observado que es relativamente resistente a pH bajo y se puede volver mas resistente al ácido después de un periodo corto de adaptación a un pH bajo moderado. A este fenómeno se le denomina respuesta de tolerancia al ácido, y se han identificado genes que codifican proteínas relacionadas al mantenimiento de la superficie celular y a bombas de eflujo, así como enzimas implicadas en generar aminos (Richlik y Barrow, 2005).

En el caso de la concentración celular presentada por *S. Typhimurium* ATCC 14028, inoculada en las suspensiones de nixtamal, indican que durante las primeras horas de la fermentación se presenta cierta viabilidad y desarrollo, pero estos mecanismos no son suficientes para lograr la permanencia del microorganismo frente al ácido láctico generado en la fermentación originando finalmente la muerte de la enterobacteria.

Trabajos previos han caracterizado cepas de *E. coli* aisladas de pozol originario de Villahermosa, Tabasco, con 6 h y 48 h de fermentación. El valor de pH de las muestras del alimento con 6 h de fermentación estuvo entre 4.7 y 6.7; para las muestras con 48 h fue de 3.7 a 4.7. De los aislados de *E. coli* obtenidos se encontraron algunos patotipos que correspondieron a *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* uropatógena. Unos aislados correspondientes a *E. coli* enteropatógena (serotipo O88:H25), fue aislado de muestras de 6 h y 48 h de fermentación donde el pH fue de 4.9 y 3.7, respectivamente, lo cual indica su resistencia a condiciones ácidas. Es probable que las cepas de *E. coli* patógenas estuvieran implicadas en brotes diarreicos de origen alimentario (Sainz *et al.*, 2001).

Las cepas enteropatógenas resistentes a las condiciones ácidas se cultivaron en caldo Luria-Bertani con un desarrollo de 10^7 a 10^8 UFC/mL, este se acidificó a pH 4.0 o pH 2.5 con HCl, con ácido láctico y ácido acético, aunque las cepas resistieron la acidificación, se determinó una mayor viabilidad en las cepas desarrolladas en el medio acidificado con ácido láctico o ácido clorhídrico y menor en ácido acético. Al determinar el perfil de las porinas OmpC y OmpA en estas cepas se observó una menor intensidad en los perfiles electroforéticos y se

incrementó la intensidad de la porina OmpX en las cepas confrontadas a los ácidos orgánicos, lo cual indicó que puede estar implicada la sobrevivencia para confrontar el estrés a estas condiciones.

Existen trabajos donde se ha reportado a *K pneumoniae* como un patógeno enteroinvasivo por consumo de hamburguesas en cadenas de comida rápida, que produce una enterotoxina termolábil (Sabota *et al.*, 1998). También se ha demostrado que cepas de este microorganismo resisten condiciones ácidas. Se han hecho fermentaciones en quimiostato donde se somete a una cepa aislada de líquidos gástricos o duodenales sometida en diferentes valores de pH. Se determinó que en intervalos de pH entre 3 y 4 las concentraciones del microorganismo fueron 10^7 UFC/mL (O'May *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, el haber demostrado la estabilidad y desarrollo de *K. pneumoniae* aislado del pozol persistente a condiciones de acidez y pH, inclusive con mayor tiempo de fermentación (48 horas más) al trabajo reportado por Sainz *et al.* (2001), indicó que existen dentro de esta familia de microorganismos presentes en este alimento fermentado, otros miembros con esta característica particular. No únicamente resisten estas condiciones, si no que, incluso desarrollan e incrementan su concentración. Esto no solo compromete la inocuidad del mismo, también representa un riesgo mayor para los consumidores a pesar de las condiciones generadas durante la fermentación láctica.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8.1. Conclusiones

Durante el desarrollo de las bacterias lácticas presentes en el sustrato ya sea presentes de forma natural, o bien inoculadas, se generaron condiciones características de la fermentación láctica, en este entorno, no se detectó la presencia de las enterobacterias en masas esterilizadas, en cambio en masas no esterilizadas se observó su permanencia. Estos resultados demuestran que existe un efecto protector generado por la microbiota natural de la masa elaborada con harina de maíz nixtamalizado que favorece la presencia de las enterobacterias

Durante las fermentaciones en masas inoculadas con *L. plantarum* se determinó el efecto antimicrobiano de la bacteria láctica aislada del *pozol* sobre la concentración de las enterobacterias. Se encontró que las enterobacterias aisladas del *pozol* persisten, lo que demuestra que están habituadas a las condiciones generadas por el grupo de las bacterias lácticas durante su desarrollo en las masas de harina de maíz nixtamalizado esterilizadas. Las enterobacterias cuyo origen fue distinto al del *pozol*, fueron satisfactoriamente inhibidas por estas condiciones.

Dado que en las fermentaciones en masas el ácido láctico fue el principal metabolito detectado y que al evaluar la concentración celular de las enterobacterias al efecto bactericida de este compuesto, se determinó que únicamente las enterobacterias aisladas del *pozol* permanecieron. Las concentraciones de ácido láctico generadas por *L. plantarum* son suficientes para la eliminación de enterobacterias no nativas. Sin embargo, las enterobacterias aisladas del *pozol*, se encuentran habituadas a las condiciones de acidez y pH generadas durante la fermentación.

La inocuidad microbiana de este alimento fermentado tradicional está comprometida por la persistencia inusual de *Klebsiella pneumoniae*.

8.2. PERSPECTIVAS

Los estudios realizados hasta el momento han mostrado la presencia de mohos que asimilan el ácido láctico generado durante la fermentación. Diversos reportes en otros alimentos indican que la generación de metabolitos (como aminoácidos y aminos) generados por los grupos presentes favorecen la permanencia de algunos miembros del consorcio microbiano, por lo tanto, se propone analizar otros miembros de la misma y su interacción con las bacterias lácticas y las enterobacterias nativas del alimento que provocan la permanencia de los grupos indeseables en el alimento.

Resultaría también interesante el estudio de la señalización química como mecanismo de comunicación entre los grupos de estudio para generar la permanencia de enterobacterias y verificar si esto se presenta en el *pozol*.

Sería importante en el caso de *Klebsiella pneumoniae* aislada del *pozol*, profundizar para que genes, enzimas y metabolismo se induce, expresa y presenta que le permita resistir las condiciones de acidez que se generan en el alimento fermentado.

El estudio se realizó únicamente con una enterobacteria aislada del alimento, pero deberían realizarse estudios similares con otros géneros y especies aislados del *pozol*, con el objetivo de verificar las causas particulares de la sobrevivencia de cada uno, sobre todo con aquellas enterobacterias que han sido reportadas como patógenas.

Realizar recomendaciones sanitarias pertinentes a los miembros de las comunidades que consumen el *pozol* con el fin de mejorar la calidad microbiológica del mismo sin afectar las propiedades organolépticas que le caracterizan.

BIBLIOGRAFÍA

- Adour L., Couriol C., Amrane A., and Prigent Y. (2002). Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 533-542.
- Ampe F. and 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. *International Journal of Food Microbiology* 60: 91–97.
- Ampe F., Ben Omar B. and Guyot J. P. (1999). Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to *pozol*, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology* 87: 131–140.
- Ampe F., Ben Omar N. B., Moizan C., Wachter C., and Guyot J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican *pozol*, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5464-5473.
- Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S. and von Wright A. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria*. 2d. edition. Marcel Dekker-USA: 1-72.
- Aziza M. and Amrane A. (2006). Commensalism during submerged mixed culture of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on glutamate and lactate. *Process Biochemistry* 41: 2452-2457.
- Ben Omar B. and Ampe F. (2000). Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough *pozol*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (9): 3664-3673.
- Bi H., Sun L., Fukamachi T., Saito H. and Kobayashi H. (2009). HU participates in expression of a specific set of genes required for growth and survival at acidic pH in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 58: 443-448.

Camacho N. (1996). Asimilación diferencial de carbohidratos por *Geotrichum* sp., aislado del *pozol*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. 61 p.

Cañas A., Wachter C., Cook, P., Barzana E., and Owens, J. (1993). Sources of microorganisms in *pozol*, a traditional mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-274.

Caplice E., and Fitzgerald G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131-149.

Carr F., Chill D., and Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28 (4): 281-370.

Charalampopoulos D., Pandiella S. and Webb C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology* 92: 851–859.

Chelule P., Mokoena M., and Gqaleni N. (2010). Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndes-Vilas (Ed.): 1160-1167.

Chinyere I. and Onyekwere S. (1996). Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Research International* 29 (5-6): 527-540

Coulin P., Farah Z. Assanvo J, Spillman H, and Puhan Z. (2006). Characterisation of the microflora of *attiéké*, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *International Journal of Food Microbiology* 106: 131-136.

Cotter P. D., Hill C., and Ross R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3: 777-788.

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

Díaz-Ruiz G., Guyot J. P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot J., and Wachter C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in *Pozol*, a mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4367–4374.

Edema M. O. and Sanni A.I. (2008). Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiology* 25: 616-625.

Encheva V., Shah H.N. and Gharbia S.E. (2009). Proteomic analysis of the adaptive response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to growth under anaerobic conditions. *Microbiology* 155: 2429–2441.

Escalante A., Wachter C and Farres A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough *pozol* as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 64: 21–31.

Felis G. and Dellaglio F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues Intestinal Microbiology* 8: 44-61.

Fleet, G. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50: 101-117.

Gadaaga T., Mutukumiraa A., Narvhusb J., and Feresuc S. (1999) A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 53: 1–11.

Giraffa G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 251-260.

Gram L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J., Christensen A., and Givskov M. (2002). Food spoilage –interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78: 79-97.

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

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

Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J., and Williams S. (2003). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Lippincott Williams and Wilkins. USA. 787 p.

Holzappel W., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. and Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl): 365S-373S.

Khalid K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1 (3): 1-13.

Knorr D. and Wacher C. (2010). Microbial ecology in foods and at the intestine. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 123-124.

Lindgren S. E. y Dobrogosz W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*: 149-164.

Lindgren S.E., Axelsson L.T., and McFeeters R.F. (1990). Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* 66: 209-214.

López G. (2006). Estudio de la variabilidad microbiológica del *pozol* mediante PCR-DGGE con el gen *rpoB*. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. 136 p.

Lorquet F., Goffin P., Muscariello L., Baudry J.B., Ladero V., Sacco M., Kleerebezem M., and Hols P. (2004). Characterization and functional analysis of the *poxB* Gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 186 (12): 3749–3759.

Mac Faddin J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3^a. ed. Médica Panamericana. España. 850 p.

Madigan M. y Martinko J. (2006). Brock Biology of Microorganisms. 11th edition. Pearson Prentice Hall, USA-351-353.

Morales E. (2011). Estudio de la presencia y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el *pozol*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 218 p.

Motarjemi Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. International Journal of Food Microbiology 75: 213-229.

Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba.

Nout R., Sarkar. P., and Beuchat L. (2007). Indigenous fermented foods In: Doyle and Beuchat (Food Microbiology Fundamentals and Frontiers 3d ed. USA: 817-835.

Nuraida L., Wachter C. and Owens J. D. (1995). Microbiology of *pozol*, a Mexican fermented maize dough. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 567-571.

Olsen A., Halm M. and Jakobsen M. (1995). The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (*kenkey*) and their interactions during fermentation. Journal of Applied Bacteriology 79: 506-512.

Olstorpe M., Axelsson L., Schnürer J., and Passoth V. (2010). Effect of starter culture inoculation on feed hygiene and microbial population development in fermented pig feed composed of a cereal grain mix with wet wheat distillers' grain. Journal of Applied Microbiology 108: 129-138.

O'May G., Reynolds N., and Macfalane G. (2005). Effect of pH on an *in vitro* model of gastric microbiota in enteral nutrition patients. Applied and Environmental Microbiology 71 (8): 4777-4783.

Ostling Ch. and Lindgren S. (1993). Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. Journal of Applied Bacteriology 75: 18-24.

Ouwehand A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria En: Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. Salminen S. and von Wright A. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. USA. 139-159.

Petrov K. and Petrova P. Applied Microbiology and Biotechnology. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. 87: 943- 949.

Pfeiler E. and Klaenhammer T. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. Trends in Microbiology 15 (12): 546-553.

Poolman B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. Antoine van Leeuwenhoek 82: 147-164.

Rivera-Espinosa Y. y Gallardo-Navarro Y. (2010). Non-dairy probiotic products. Food Microbiology 27: 1-11.

Rodríguez A. y Villalva B. (2010). Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aislada del pozol. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 78 p.

Rychlik L., and Barrow P. A. (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. FEMS Microbiology Reviews 29: 1021-1040.

Sabota J., Hoppes W., Ziegler R., Dupont H., Mathewson J., and Rutecki G. (1998). A new variant of food poisoning: Enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. The American Journal of Gastroenterology 93 (1): 118-119.

Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centurión D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A. and Eslava C. (2001). Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. International Journal of Food Microbiology 71: 169-176.

Sainz T., Pérez J., Villaseca J., Hernández U., Eslava C., Mendoza G., and Wachter C. (2005). Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from *pozol*, a Mexican typical maize fermented food. International Journal of Food Microbiology 105: 357-367.

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

Santillana R. (1995). Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y *pozol*. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. 84 p.

Savadogo A., Outtara C., Bassole I., and Traore A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. African Journal of Biotechnology 5 (9): 678-683.

Schleifer K., and Ludwig W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood B., Holzapfel W. (Eds.). The genera of lactic acid bacteria. London. Chapman and Hall: 7-18.

Scott R., and Sullivan W. (2008). Ecology of fermented foods. Human Ecology Review 15 (1): 25-31.

Sedewitz B., Schleifer K.H. and Gotz F. (1984). Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. 160 (1): 462-465.

Servin A. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 28: 405-440.

Siaw M.E., Sakyi-Dawson E., and Amoa Awua W. K. (2003). Antimicrobial interactions of microbial species involves in the fermentario of cassava dough into *agbelima* with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. International Journal of Food Microbiology 89: 41-50.

Simango C. and Rukure G. (1992). Survival of bacterial enteric pathogens in traditional fermented foods. Journal of Applied Microbiology 73 (1): 37-40.

Steinkraus K. (1986). Fermented foods, feeds and beverages. Biotechnology Advances 4: 219-243.

Steinkraus K.(Ed.) (1995). Handbook of Indigenous Fermented Foods 2d ed. USA. 776 p.

Steinkraus K. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8 (5-6): 311-317.

Stiles M. and Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1- 29

Syu M.J. (2001). Biological Production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 10-18.

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

Teixeira de Mattos M., Streekstra H. and Tempest D. (1984). Metabolic uncoupling of substrate level phosphorylation in anaerobic glucose-limited chemostat cultures of *Klebsiella aerogenes* NCTC418. *Archives of Microbiology* 139: 260-264.

Tetteh G., Sefa-Dedeh S., Dixon R., and Beuchat L. (2004). Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Shigella flexneri* in a traditional fermented Ghanaian weaning food as affected by fortification with cowpea. *International Journal of Food Microbiology* 90: 189-195.

Trevor G. O'Sullivan D., and McKay L. (2004). Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 isolated from *pozol*, a Mexican fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1): 631–634.

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

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

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

Valerio F., De Bellis P., Lonigro S.L., Visconti A. and Lavermicocca P (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* rosy spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 122: 328–332.

Van den Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Stanislav D., and Maguin E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 82: 187-216.

Wacher C. (1995). Estudios sobre la microbiología del *pozol*. Tesis de doctorado. Facultad de Química UNAM. 174 p.

Wacher C., Cañas A., Bárzana E., Lappe P., Ulloa M. and Owens D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo *pozol* fermentations. *Food Microbiology* 17: 251-256.

Wang A., Wang Y., Jiang T., Li I., Ma C. y Xu P. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production (2010). *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 965-970.

Withers H., Swift S., and Williams P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4: 186-193.

ANEXO I. IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS CON EL SISTEMA API 20E®.

La identificación de la enterobacteria aislada del *pozol* se realizó mediante el sistema minaturizado de identificación bioquímica API 20E (BioMérieux).

El API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, que incluyen 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas, así como una base de datos. La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los compuestos químicos contenidos en ellos, la composición de la galería se muestra en la figura A.I.1. Las reacciones producidas durante el período de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o que se revelan mediante la adición de reactivos

Las colonias aisladas de 24 horas de los medios selectivos correspondientes fueron resuspendidas en 5 mL de agua estéril hasta llegar a una escala de 0.5 en McFarland (aproximadamente equivale a 1.5×10^8 células/mL) La lectura de estas reacciones se llevó a cabo utilizando la Tabla de Lectura (Tabla A.I.1.), y la identificación se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación (ApiWeb V: 1.1.0; 2003).

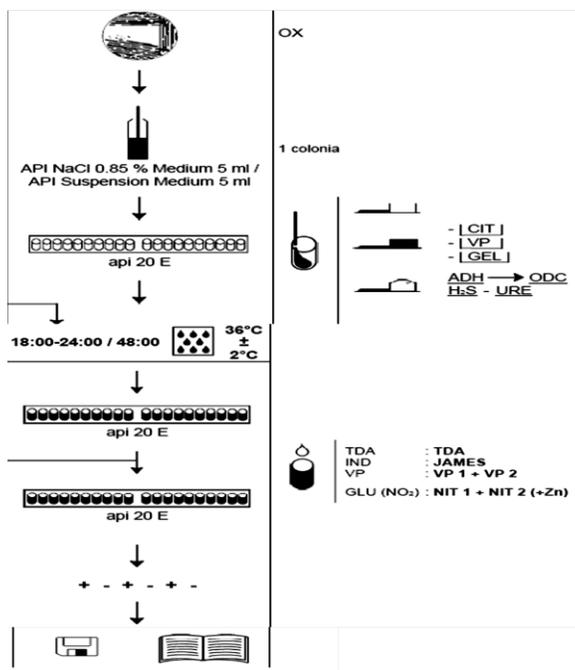


Figura A.I.1. Esquema de inoculación e interpretación de la galería API 20E®.

Tabla A.I.1. Tabla de lectura. Componentes, reacciones/enzimas y resultados de lectura para las diferentes pruebas incluidas en el sistema de API20E ® (BioMérieux).

PRUEBA	COMPONENTES ACTIVOS	CONC. (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				Negativo	Positivo
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0.233	B-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	Incoloro	Amarillo
ADH	L-arginina	1.9	Arginina-dihidrolasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
LDC	L-lisina	1.9	Lisina Decarboxilasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
ODC	L-ornitina	1.9	Ornitina Decarboxilasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
CIT	Citrato trisódico	0.756	Utilización del citrato	Verde pálido/amarillo	Azul-verde/azul
H ₂ S	Tiosulfato sódico	0.075	Producción de H ₂ S	Incoloro/grisáceo	Depósito negro/fin liserado
URE	Urea	0.76	Ureasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
TDA	L-triptófano	0.38	Triptofano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0.19	Producción de indol	Incoloro Verde pálido/amarillo	Rosa
VP	Piruvato sódico	1.9	Producción de acetoína (Voges Proskauer)	incoloro	Rosa/rojo
GEL	Gelatina (origen bovino)	0.6	Gelatinasa (gelatina)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1.9	Fermentación/oxidación (glucosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1.9	Fermentación/oxidación (manitol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	1.9	Fermentación/oxidación (inositol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentación/oxidación (sorbitol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	L-ramnosa	1.9	Fermentación/oxidación (ramnosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	D-sacarosa	1.9	Fermentación/oxidación (sacarosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	D-melibiosa	1.9	Fermentación/oxidación (melibiosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	0.57	Fermentación/oxidación (amigdalina)	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	L-arabinosa	1.9	Fermentación/oxidación (arabinosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo

ANEXO II. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) AL EMPLEAR LA PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY CON EL USO DEL PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 5.

Para determinar si las diferencias observadas en el desarrollo de las enterobacterias en las fermentaciones realizadas en el estudio fueron significativas ($P < 0.05$), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey con el uso del programa GraphPad Prism 5. Se compararon la concentración de enterobacterias para cada fermentación en cada tiempo de muestreo.

Tabla A.II.1. Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en masas de harina de nixtamal comercial en presencia y/o ausencia de la microbiota nativa, sin inocular o inoculadas con los grupos microbianos de estudio.

Tiempo (h)	Fermentaciones comparadas					
	A	B	C	D	E	F
0	S	S	S	S	S	N
3	S	S	S	S	S	N
6	S	S	S	S	S	N
9	S	S	S	S	N	S
15	S	S	S	S	S	S
24	N	S	N	S	N	S
48	S	N	S	S	S	S
72	S	S	S	N	N	S
96	S	S	S	S	S	N

S, diferencias significativas ($P < 0.05$), N, diferencias no significativas ($P < 0.05$).

A. Masas no esterilizadas sin inocular vs. Masas no esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

B. Masas no esterilizadas sin inocular vs. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

C. Masas no esterilizadas sin inocular vs. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *K. pneumoniae* caso clínico.

D. Masas no esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 vs. Masas esterilizadas inoculada con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

E. Masas no esterilizadas inoculada con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 vs. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *K. pneumoniae* caso clínico.

F. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 vs. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* Pz-9 y *K. pneumoniae* caso clínico.

Tabla A.II.2. Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en masas de harina de nixtamal comercial esterilizadas e inoculadas con *Lactobacillus plantarum* Pz-9 aislado del *pozol* y con las enterobacterias empleadas en el estudio.

Tiempo (h)	Fermentaciones comparadas		
	A	B	C
0	N	N	N
3	S	S	N
6	N	N	N
9	S	S	S
15	S	S	S
24	S	S	S
48	S	S	S
72	S	S	S
96	S	S	N

S, diferencias significativas ($P < 0.05$), N, diferencias no significativas ($P < 0.05$).

A. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del *pozol* vs. masas esterilizadas inoculada con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del caso clínico.

B. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del *pozol* vs. masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

C. Masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *K. pneumoniae* aislada del caso clínico vs. masas esterilizadas inoculadas con *L. plantarum* y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Tabla A.II.3. Resumen de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las fermentaciones en suspensiones de harina de nixtamal inoculadas con las enterobacterias empleadas en el estudio con adición externa de una concentración equivalente de ácido láctico al generado por *L. plantarum* Pz-9.

Tiempo (h)	Fermentaciones comparadas		
	A	B	C
0	N	S	S
3	N	S	S
6	N	S	S
9	N	S	N
15	S	S	S
24	S	S	N
48	S	S	S
72	S	S	N
96	S	S	N

S, diferencias significativas ($P < 0.05$), N, diferencias no significativas ($P < 0.05$).

- A.** Suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del *pozol* vs. suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del caso clínico.
- B.** Suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del *pozol* vs. suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028.
- C.** Suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *K. pneumoniae* aislada del caso clínico vs. suspensiones de harina de nixtamal esterilizadas inoculadas con *S. Typhimurium* ATCC 14028.