



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Producción de atole agrio usando *Lactococcus lactis*  
(A1MS3) Y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) como inóculo**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JESSICA VIANNEY HERNÁNDEZ VEGA**

**ASESOR DE TESIS**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: María del Carmen Wacher Rodarte**

**VOCAL:**                 **Profesor: Francisco Ruiz Terán**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Aleida Mina Cetina**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Ana Lilia Cruces Martínez**

**2° SUPLENTE:**        **Profesor: Gloria Díaz Ruiz**

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

**LABORATORIO 324, EDIFICIO “E”, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

---

**Dra. María del Carmen Wacher Rodarte**

**ASESOR DEL TEMA**

---

**Dra. Gloria Díaz Ruiz**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**Jessica Vianney Hernández Vega**

**SUSTENTANTE**



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cereales.....	3
2.2 Maíz.....	4
2.2.1 Composición del maíz.....	5
2.2.2 Calidad nutrimental del maíz.....	9
2.3 Fermentación de los alimentos, aplicaciones y beneficios.....	10
2.3.1 Fermentación controlada y cultivos iniciadores.....	12
2.3.2 Alimentos fermentados a base de cereales.....	14
2.4 Bacterias Ácido Lácticas.....	19
2.4.1 Metabolismo de carbohidratos en las BAL.....	21
2.4.2 Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas.....	24
2.5 Alimentos fermentados de México.....	25
2.5.1 Atoles fermentados de maíz.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Reactivación, verificación de pureza y conservación de cepas aisladas del atole agrio.....	34
6.2 Preparación de atoles de prueba.....	34
6.3 Selección de maíz y cepas a utilizar para realizar la fermentación inoculada de atole agrio.....	36
6.4 Fermentación natural e inoculada de prueba y producción de atole agrio....	37



<b>6.5 Parámetros a evaluar del atole agrio</b> .....	<b>42</b>
6.5.1 Determinación de pH.....	42
6.5.2 Determinación de acidez titulable.....	42
6.5.3 Cuantificación de grupos microbianos.....	42
6.5.4 Cuantificación de carbohidratos totales.....	44
6.5.5 Cuantificación de carbohidratos reductores.....	44
6.5.6 Prueba sensorial.....	45
<b>6.6 Perfil sensorial de las muestras de atole agrio</b> .....	<b>46</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>7.1 Experimentos preliminares</b> .....	<b>48</b>
7.1.1 Reactivación de las cepas.....	48
7.1.2 Selección de maíz y de las cepas.....	50
<b>7.2 Fermentaciones del atole agrio</b> .....	<b>52</b>
7.2.1 Comparación de los valores de acidez titulable (% ácido láctico) de las fermentaciones.....	52
7.2.2 Comparación de los valores de pH de las fermentaciones.....	54
7.2.3 Crecimiento de microorganismos en las fermentaciones.....	56
7.2.4 Concentración de carbohidratos durante las fermentaciones.....	65
<b>7.3 Perfil sensorial del atole agrio</b> .....	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>74</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>10. ANEXO</b> .....	<b>76</b>
<b>10.1 Comparación de los valores de acidez titulable (% ácido láctico) de las fermentaciones</b> .....	<b>76</b>
<b>10.2 Crecimiento de microorganismos en las fermentaciones</b> .....	<b>76</b>
<b>10.3 Concentración de carbohidratos durante las fermentaciones</b> .....	<b>78</b>
<b>10.4 Fundamento del método de Fenol-Sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales</b> .....	<b>81</b>
<b>10.5 Fundamento del método de DNS para la determinación de carbohidratos reductores</b> .....	<b>81</b>



<b>10.6 Métodos empleados para la evaluación sensorial del atole agrio.....</b>	<b>83</b>
10.6.1 Perfil Flash.....	83
10.6.2 Análisis Generalizado de Procrustes (AGP).....	83
10.6.3 Preference Mapping.....	84
<b>10.7 Medios de cultivo.....</b>	<b>85</b>
<b>10.8 Técnica de conservación de cepas.....</b>	<b>89</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>90</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.2.1. Principales países productores de maíz (1998-2008).....	5
Figura 2.2.1.1. Esquema de la morfología del grano de maíz.....	6
Figura 2.4.1.1. Principales vías de fermentación de la glucosa.....	23
Figura 6.1. Plan de los experimentos (Etapa 1 y 2).....	32
Figura 6.3.1. Maíz seleccionado para la producción de atole agrio.....	36
Figura 6.4.1. Diagrama para producción de atole agrio y parámetros a evaluar.....	38
Figura 6.4.2. Molienda del maíz con molino manual.....	39
Figura 6.4.3. Muestras de atole agrio después de las 24 horas de fermentación.....	39
Figura 6.4.4 Preparación e inoculación del cultivo iniciador para realizar la fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) y <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10).....	40
Figura 6.4.5 Preparación e inoculación del cultivo iniciador para realizar la fermentación mixta inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) y <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10).....	41
Figura 6.5.3.1. Procedimiento para cuantificación de microorganismos.....	43
Figura 6.6.1. Evaluación sensorial de las muestras de atole agrio por los jueces....	47
Figura 7.2.3.1. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio.....	56
Figura 7.2.3.2. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) del atole agrio.....	58
Figura 7.2.3.3. Concentración microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	59
Figura 7.2.3.4. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) y <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	61



Figura 7.2.4.1. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio.....	68
Figura 7.2.4.2. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>L. lactis</i> (A1MS3) del atole agrio.....	68
Figura 7.2.4.3. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>P. pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	69
Figura 7.2.4.4. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con <i>L. lactis</i> y <i>P. pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	69
Figura 7.3.1. Análisis Generalizado de Procrustes (GPA): atributos de apariencia y textura de las muestras de atole agrio.....	71
Figura 7.3.2. Análisis Generalizado de Procrustes (GPA): atributos de olor y sabor de las muestras de atole agrio.....	73
Figura 10.1.1. Valores de acidez titulable (% ácido láctico) de la fermentación natural, fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3), fermentación inoculada con <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) y fermentación mixta, inoculada con ambas cepas, del atole agrio.....	76
Figura 10.3.1. Curva patrón del método de Fenol-Sulfúrico para obtener la concentración de carbohidratos totales.....	78
Figura 10.3.2. Segunda curva patrón del método de Fenol-Sulfúrico para obtener la concentración de carbohidratos totales.....	79
Figura 10.3.3. Curva patrón del método de DNS para obtener la concentración de carbohidratos reductores.....	79





## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.2.1.1. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%).....	6
Cuadro 2.2.2.1. Valor nutrimental del maíz.....	9
Cuadro 2.3.2.1. Algunos productos fermentados tradicionales a base de cereales consumidos en Europa, África y América Latina que pueden ser consumidos en un estado crudo o parcialmente cocido y que contienen microorganismos vivos...	17
Cuadro 2.4.2.1. Productos metabólicos de bacterias ácido lácticas con propiedades antimicrobianas.....	24
Cuadro 2.5.1. Bebidas fermentadas de maíz que han sido consumidas o que se consumen en varios lugares de México.....	27
Cuadro 6.1.1. Cepas de bacterias lácticas aisladas del atole agrio.....	34
Cuadro 7.1.1.1. Descripción microscópica de las cepas.....	48
Cuadro 7.1.2.1. Valor de pH del atole agrio obtenido por fermentación natural con los diferentes lotes de maíz.....	51
Cuadro 7.1.2.2. Descripción informal de las características de los atoles de prueba obtenidos por fermentación natural.....	51
Cuadro 7.2.1.1. Valores de acidez titulable (% ácido láctico) de la fermentación natural, fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3), fermentación inoculada con <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) y fermentación mixta; inoculada con ambas cepas, del atole agrio.....	52
Cuadro 7.2.2.1. Valores de pH de la fermentación natural, fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3), fermentación inoculada con <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) y fermentación mixta del atole agrio.....	54
Cuadro 10.2.1. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio (logUFC/mL).....	76
Cuadro 10.2.2. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) del atole agrio (logUFC/mL).....	77



Cuadro 10.2.3. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio (logUFC/mL).....	77
Cuadro 10.2.4. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con <i>Lactococcus lactis</i> (A1MS3) y <i>Pediococcus pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio (logUFC/mL).....	78
Cuadro 10.3.1. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH durante la fermentación natural del atole agrio.....	80
Cuadro 10.3.2. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación inoculada con <i>L. lactis</i> (A1MS3) del atole agrio.....	80
Cuadro 10.3.3. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación inoculada con <i>P. pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	80
Cuadro 10.3.4. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación mixta inoculada con <i>L. lactis</i> (A1MS3) y <i>P. pentosaceus</i> (Sol10) del atole agrio.....	80



## RESUMEN

En el presente proyecto de investigación se realizó la producción de atole agrio usando dos cepas; *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) como cultivo iniciador. El atole agrio de dobla es una bebida tradicional de Tabasco a partir de maíz de dobla; sin embargo, debido a la dificultad por obtener este tipo de maíz durante cualquier época del año se realizó la producción de atole a partir de maíz seco obtenido en la Ciudad de México.

Para la producción del atole agrio se realizaron algunas modificaciones en el proceso tradicional, obteniéndose solo el producto a partir de una fermentación líquida monitoreada de las 0 hasta las 24 horas y utilizando material estéril para reducir la carga microbiana de fuentes externas y sólo cuantificar la microbiota presente en el sustrato. Una vez obtenido el producto deseado se evaluaron diferentes parámetros entre los cuales se encuentran la determinación de pH, acidez titulable, cuantificación de microorganismos, cuantificación de carbohidratos totales y reductores y la determinación de atributos de las muestras evaluadas.

Los valores de pH y acidez titulable iniciales y finales en las fermentaciones naturales e inoculadas son similares, aunque la velocidad de descenso de pH es mayor durante las fermentaciones inoculadas. Comparando el comportamiento de los cuatro atoles obtenidos se encontró que con la cepa de *P. pentosaceus* (Sol10) se obtiene una mayor concentración de ácido láctico, mientras que con *L. lactis* (A1MS3) se obtiene una concentración menor con respecto a las demás. De manera general, las cuentas de bacterias lácticas al final de las fermentaciones siempre fueron elevadas y la cuenta de enterobacterias, que son bacterias indeseables en el producto no se eliminaron completamente en ningún caso, sin embargo la concentración de estas bacterias es menor al inocularse el atole con la cepa de *P. pentosaceus* (Sol10).



La concentración de carbohidratos disminuyó con respecto a la inicial, debido al consumo de los sustratos presentes y a la rápida multiplicación de los microorganismos. De acuerdo con los resultados de la prueba sensorial se encontró que hay diferencia entre las cuatro muestras, ya que cada una presentó diferentes atributos que las describen.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados indígenas han jugado un papel vital en la historia del desarrollo del hombre; ofrecen una multitud de sabores, aromas y texturas que enriquecen su nutrición (Steinkraus, 1993). Los alimentos y bebidas fermentadas son definidos como aquellos productos que han estado sujetos al efecto de microorganismos o enzimas para causar cambios bioquímicos deseables (Kohajdová, 2015). Los microorganismos responsables de la fermentación forman parte de la microbiota autóctona presente en el sustrato, o pueden ser añadidos como un cultivo iniciador (Esquivel, 2012). La fermentación ha sido utilizada por siglos y en muchos países para conservar y mejorar la calidad nutricional de muchos alimentos, además de fortificar sustratos sin la necesidad de utilizar conservadores (Peyer, Zannini & Arendt, 2016). En México se elaboran productos autóctonos como los atoles agrios de maíz, los cuales son muy consumidos en el centro y sur del país (Herrera, 1993).

El atole agrio es una bebida típica del Sureste de México, es consumido en Tabasco, Chiapas, el sur de Veracruz (Valderrama, 2012) y en Oaxaca (Cruz & Ulloa, 1973). El atole agrio de dobla es una bebida fermentada tradicional que se prepara en Tabasco a partir de maíz de dobla. Este producto sin embargo no ha sido estudiado ampliamente y el proceso de elaboración reportado en los pocos estudios que se han realizado anteriormente es variable, ya que depende totalmente del tipo de maíz y de las condiciones utilizadas.

Del atole agrio de dobla se han aislado e identificado bacterias lácticas y levaduras en las diferentes etapas de la fermentación. Las bacterias lácticas predominantes son de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Las bacterias lácticas caracterizadas cuentan con propiedades funcionales importantes y éstas son específicas a nivel más alto de la especie, es decir, microorganismos de la misma especie pueden tener propiedades diferentes (Cocconceli, 2013).



La microbiota encontrada es variable, por lo que las características del atole pueden variar. Para asegurar la presencia de estas bacterias se inoculó el atole agrio producido con cultivos puros de *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10). En un proyecto propuesto anteriormente, se estudió la fermentación de bacterias lácticas, en el cual se ha logrado que el cultivo se desarrolle adecuadamente, pero debido a la dificultad para adquirir el maíz de doble de Villahermosa, ya que es estacional, se realizaron pruebas con otro tipo de maíz adquirido en la Ciudad de México.

Se inoculó el atole con cultivos puros de cepas aisladas, identificadas y caracterizadas previamente por Vâkevâinen (U. de Europa Oriental, Kuopio, Finlandia, comunicación personal). En este trabajo se cuantificó el crecimiento microbiano de bacterias lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos y levaduras; se determinó el valor de pH, la concentración de carbohidratos totales y reductores, y productos de fermentación (ácido láctico). Por último se realizó un análisis sensorial para describir las bebidas obtenidas con las diferentes cepas; así como la mezcla de ellas, en colaboración con la Dra. Patricia Severiano, para determinar los atributos de cada bebida.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cereales

Son un conjunto de plantas herbáceas de la familia de las gramíneas, formada por 35 géneros y 10000 especies cuyos granos o semillas se emplean para la alimentación humana y de los animales (Mendoza & Calvo, 2010). Los miembros de la familia “Gramíneas” que producen granos de cereal, generan frutos secos con una sola semilla. Este tipo de fruto es una *cariópside* que vulgarmente se denomina grano (Hoseney, 1991). Los cereales son las semillas comestibles (granos) de las plantas herbáceas (Gramíneae). La semilla se encuentra frecuentemente rodeada de brácteas (cascarillas) que se mantienen después de la recolección. Los granos, una vez separados de sus cáscaras, son comestibles y nutritivos (Dendy & Dobraszezyk, 2001).

Los cereales han constituido desde el descubrimiento de la agricultura el ingrediente más importante en la alimentación de la humanidad. Se considera que son la base de las grandes civilizaciones, por su contenido elevado de hidratos de carbono, proteínas aunque en baja concentración y la calidad de éstas se halla limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales; sobre todo lisina y triptófano, fibra y algunas vitaminas (Mendoza & Calvo, 2010). Los principales cereales son trigo, cebada, arroz, maíz, centeno, mijo y avena (Belitz & Grosch, 1997).



## 2.2 Maíz

Durante miles de años se ha cultivado permanentemente el maíz (*Zea mays*) en América Central (Dendy & Dobraszezyk, 2001). El maíz ha sido la base de la alimentación de las culturas mesoamericanas desde tiempos prehispánicos (Paredes, Guevara & Bello, 2006) y actualmente es la principal fuente de proteínas y calorías en muchos países de América Latina (Paredes & Valverde, 2006).

En la actualidad se siembran en todo el mundo más de 129 millones de hectáreas de maíz. Dicho cereal es relativamente barato y fácil de cultivar, tanto el grano como sus subproductos tienen una utilización muy diversa. El maíz indudablemente ha tenido una influencia primordial en el uso global de la tierra, en nuestra dieta y en la calidad de nuestras vidas (Dendy & Dobraszezyk, 2001).

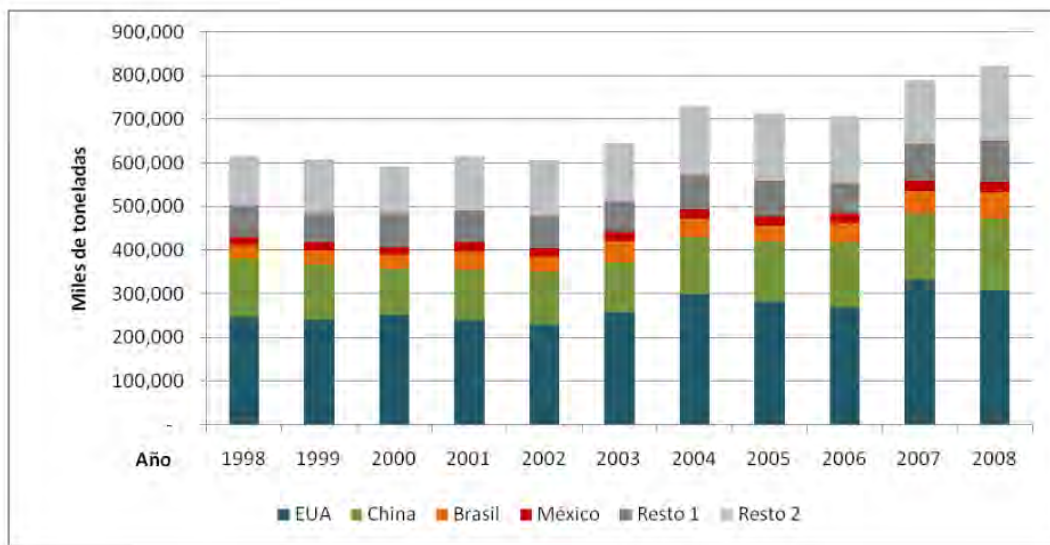
Los primeros colonizadores europeos en América cultivaron el maíz y de esta manera fueron capaces de sobrevivir durante los primeros inviernos en el Nuevo Mundo. En la actualidad Estados Unidos cultiva aproximadamente el 41% de la producción total de maíz (576 millones de toneladas métricas). La mayor parte de esta producción se realiza en el enorme cinturón fértil que se extiende desde el este de Ohio al este de Nebraska. Esta zona se le ha denominado “cinturón del maíz” y cuenta con las condiciones ideales para su cultivo. Usualmente el suelo está húmedo de forma continua durante los períodos de mayor crecimiento del maíz y el clima es suave con abundante calor solar; condiciones que la planta necesita para su maduración (Dendy & Dobraszezyk, 2001).

Dentro de los granos básicos, el maíz presentó mayor incremento en el volumen de producción, pues con una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 2.7%, pasó de 615.8 millones en 1998 a 822.7 millones en el 2008. El 80% de la producción de maíz se concentró en 10 países; Estados Unidos ocupó el 1° lugar con 40%, China el 2° con el 20%, Brasil en el 3° con el 6% y México en 4° con el 3% de la producción. Los otros seis países fueron Argentina, Francia, la





India, Indonesia, Italia y Sudáfrica, que en conjunto agruparon el 11% del volumen producido de maíz (SAGARPA, 2011).



**Figura 2.2.1. Principales países productores de maíz (1998-2008)**

Fuente: SAGARPA, 2011.

### 2.2.1 Composición del maíz

La composición química del grano de maíz se ve afectada por el genotipo, el medio ambiente y las condiciones de siembra (Paredes & Valverde, 2006). Desde el punto de vista estructural, el grano está formado por cuatro partes principales:

1) El pericarpio, cáscara o salvado; constituye el 5-6% del grano (Hoseney, 1991). Se caracteriza por su elevado contenido en fibra (Gil, 2010); aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%) (FAO, 2016).

2) El endospermo; que está formado por el endospermo amiláceo y la capa de aleurona, la cual es rica en proteínas y contiene grandes cantidades de grasa, enzimas y vitaminas (Belitz & Grosch, 1997). El endospermo contiene un nivel



elevado de almidón (88%), proteínas (8%) y un contenido relativamente bajo de grasa (Gil, 2010).

3) El germen o embrión; es relativamente grande, constituye un 10-14% del grano (Hoseney, 1991). El germen es la estructura a partir de la cual se desarrollará una nueva planta (Benítez & Pfeiffer, 2006) y se une al endospermo a través del escutelo (Belitz & Grosch, 1997). Se caracteriza por el alto contenido en grasa (33%), proteínas (18.5%) y minerales (10.5%) (Gil, 2010).

4) Pílorriza; tejido inerte en que se unen el grano y el carozo (Mendoza & Calvo, 2010).

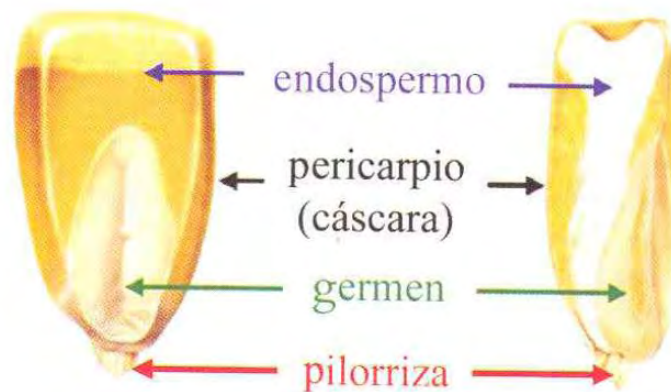


Figura 2.2.1.1. Esquema de la morfología del grano de maíz

Fuente: Benítez & Pfeiffer, 2006

Cuadro 2.2.1.1. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: Watson, 1987.



El componente principal del grano de maíz es el almidón, al que corresponde el 72-73% del peso del grano (Gil, 2010). El almidón es el principal carbohidrato de reserva de los cereales y está presente mayoritariamente en el endospermo. El almidón de los cereales está formado por un 25% de amilosa y un 75% de amilopectina. Los cereales contienen otros polisacáridos, entre ellos se encuentran hemicelulosas, pentosanos, celulosa,  $\beta$ -glucanos y glucofructanos. Estos polisacáridos son constituyentes de la estructura de las paredes celulares y abundan más en las porciones externas del grano (Belitz & Grosch, 1997).

Las proteínas constituyen el siguiente componente en importancia del grano. En las variedades comunes su proporción puede variar entre el 8 y el 11 % del peso del grano, y en su mayor parte se encuentra en el endospermo (Gil, 2010). En el maíz; las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo y han recibido el nombre de zeínas, mientras que las glutelinas se encuentran en la matriz proteica de esta misma estructura. Ambas proteínas constituyen cerca del 90% del total de las proteínas presentes en el grano completo (Paredes et al., 2006). El contenido de lisina en todos los cereales es bajo y también el de metionina, especialmente en trigo, centeno, cebada, avena y maíz (Belitz & Grosch, 1997). La calidad nutricional del maíz está determinada por la composición en aminoácidos de sus proteínas (Gil, 2010). Se ha determinado el patrón de aminoácidos esenciales; como resultado se ha encontrado que tanto la zeína como la glutelina son deficientes en lisina y triptófano. Otro aspecto sobresaliente de la calidad de la proteína del maíz es su alto contenido de leucina pero bajo contenido de isoleucina. Este desbalance provoca que el valor biológico de la proteína disminuya (Paredes et al., 2006).

Los lípidos del grano de maíz se encuentran sobre todo en el germen y están determinados genéticamente, con valores que van del 3 al 18% (Gil, 2010). En el caso del maíz, los lípidos sirven como fuente para la producción de aceite (Belitz & Grosch, 1997). El aceite de maíz tiene un bajo contenido de ácidos grasos saturados; palmítico y esteárico, mientras que presentan valores elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoléico (44%) y ácido



oléico (37%) (Gil, 2010). El germen y la capa de aleurona son ricos en triglicéridos, predominando en el endospermo fosfo y glicolípidos (Belitz & Grosch, 1997).

El contenido de cenizas en el grano es de aproximadamente 1.3%. El germen proporciona casi el 78% de todos los minerales del grano. El mineral más abundante es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio, encontrándose en su totalidad en el germen. Otros minerales son potasio, calcio, magnesio, sodio, hierro, cobre, manganeso y zinc (Gil, 2010).

El grano de maíz contiene dos vitaminas liposolubles, provitamina A o carotenoides (en el maíz amarillo) y vitamina E. La mayoría de los carotenoides se hallan en el endospermo, con pequeñas cantidades en el germen, mientras que la vitamina E se encuentra mayoritariamente en el germen. Las vitaminas hidrosolubles se localizan sobre todo en la capa de aleurona del grano de maíz, y en menor medida, en el germen y el endospermo. El maíz no contiene vitamina B12, y el grano maduro posee muy pequeñas cantidades de vitamina C. Otras vitaminas, como ácido fólico o ácido pantoténico, se encuentran en cantidades muy pequeñas (Gil, 2010).



## 2.2.2 Calidad nutrimental del maíz

De acuerdo con el tipo de maíz, el contenido nutrimental del grano puede variar. En el siguiente cuadro se muestra el valor nutrimental del grano de maíz amarillo; que es el tipo de maíz que se empleó en el proyecto realizado, y el valor nutrimental del maíz blanco, ambos son de consumo frecuente en la población.

**Cuadro 2.2.2.1. Valor nutrimental del maíz**

<b>Nutrimento (unidad)</b>	<b>Maíz amarillo</b>	<b>Maíz blanco</b>
Energía (kcal)	365	365
Humedad (%)	10.80	10.60
Fibra dietética (g)	3.20	3.20
Hidratos de carbono (g)	74.26	74.26
Proteínas (g)	9.42	9.42
Lípidos totales (g)	4.74	4.74
Calcio (mg)	159.00	159.00
Fósforo (mg)	235.00	228.00
Hierro (mg)	2.70	2.70
Magnesio (mg)	147.00	147.00
Sodio (mg)	1.00	1.00
Potasio (mg)	284.00	2.84
Zinc (mg)	2.21	2.21
Vitamina A (RAE)	11.00	0.00
Ácido ascórbico (mg)	0.00	0.00
Tiamina (mg)	0.34	0.36
Riboflavina (mg)	0.08	0.05
Niacina (mg)	1.60	1.90
Piridoxina (mg)	0.62	0.62
Ácido fólico (µg)	19.00	-----
Cobalamina (µg)	0.00	0.00

RAE: Equivalente de la actividad del retinol, estándar internacional para la medición de la vitamina A. Fuente: Mendoza & Calvo, 2010.



### 2.3 Fermentación de los alimentos, aplicaciones y beneficios

La fermentación de los alimentos a lo largo de la historia de la humanidad, ha sido la forma más común de conservar alimentos perecederos, para de este modo mantener e incluso en algunos casos mejorar el valor nutricional de éstos (Ouweland & Röytiö, 2015). Los alimentos fermentados fueron originados hace 1000 años aproximadamente, en diferentes regiones del mundo, cuando los microorganismos fueron introducidos incidentalmente en alimentos locales (Campbell-Platt, 2014). Antiguas civilizaciones desde 3000 hasta el 5000 a.C. en el Valle del Indo, Mesopotamia y Egipto desarrollaron habilidades excepcionales en la producción de alimentos fermentados a partir de leche, frutas, granos de cereal y otros productos (Ray & Bhunia, 2010). La cantidad de alimentos fermentados abarca alrededor de un tercio de los alimentos consumidos a nivel mundial, y de 20-40% (por peso) de dietas individuales. Los tres principales grupos de alimentos fermentados son productos y bebidas de cereales, y productos lácteos (Campbell-Platt, 2014).

La fermentación se realiza comúnmente en muchas partes del mundo, incrementando la posibilidad de mejorar fácilmente propiedades del alimento como son el sabor, la textura, el valor nutrimental y la vida de anaquel (Gotcheva, Pandiella, Angelov, Roshkova & Webb, 2000). Además la fermentación puede mejorar la digestibilidad y la calidad nutricional a través del enriquecimiento de sustratos alimenticios con vitaminas, proteínas, aminoácidos y ácidos grasos esenciales (Steinkraus, 2002). La fermentación incrementa considerablemente la variedad en la dieta humana, además de aportar micronutrientes esenciales (Campbell-Platt, 2014).

Una primer promoción “científica” de los alimentos fermentados especialmente como productos saludables llegó a principios de 1900 con Ilya Metchnikoff, quien descubrió el yogurt fermentado con *Bacillus bulgaricus*, e insistió en que las personas que lo consumían de forma continua vivían más años (Ouweland &



Röytiö, 2015). La fermentación juega diferentes papeles en el procesamiento de alimentos. Los principales papeles atribuidos son (Ray & Joshi, 2015):

- 1) Conservación de alimentos a través de la formación de metabolitos inhibitorios como son ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico), etanol, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, bacteriocinas, etc., a menudo en combinación con la reducción de actividad de agua (por deshidratación o por el uso de sales).
- 2) Mejoramiento de la seguridad de los alimentos a través de la inhibición o eliminación de microorganismos patógenos.
- 3) Mejoramiento del valor nutricional.
- 4) Calidad sensorial de los alimentos.

Los alimentos y bebidas fermentadas son definidos como aquellos productos que han estado sujetos al efecto de microorganismos o enzimas para causar cambios bioquímicos deseables. Steinkraus (2002) clasificó a las fermentaciones en los siguientes 4 grupos: alcohólica, ácido láctica, ácido acética y fermentación alcalina. La fermentación ácido láctica es principalmente llevada a cabo por las bacterias ácido lácticas (Kohajdová, 2015).

La bioconservación es el uso de compuestos de origen “natural”, por ejemplo, productos derivados del metabolismo microbiano para conservar alimentos. Una de las formas más antiguas para enriquecer un alimento con sustancias inhibitorias contra la descomposición y los patógenos alimentarios es la fermentación. En este contexto, se puede definir ampliamente la bioconservación como el uso de microorganismos seguros y/o sus sustancias antimicrobianas, naturalmente presentes o deliberadamente adicionadas, para extender la vida de anaquel y potenciar la seguridad de los alimentos (Corsetti, Pepetuni & Tofalo, 2015). Los microorganismos utilizan componentes presentes en los sustratos para generar energía, componentes celulares, para multiplicarse y producir productos secundarios útiles que se excretan en el ambiente (Ray & Bhunia, 2010). Los



grupos más comunes de microorganismos involucrados en fermentaciones de alimentos son las bacterias, las levaduras y los hongos (Ray & Joshi, 2015).

Los alimentos fermentados son un grupo grande de “alimentos funcionales”, los cuales proporcionan beneficios adicionales a nuestra dieta más allá de los esperados desde el punto de vista de los nutrientes presentes. Se cree que los alimentos fermentados ayudan a mejorar la calidad de vida humana y también a retrasar o prevenir el comienzo de algunas enfermedades, incluyendo el cáncer y algunas enfermedades degenerativas (Campbell-Platt, 2014).

### **2.3.1 Fermentación controlada y cultivos iniciadores**

En la fermentación llamada controlada o de cultivo puro, primero se purifican los microorganismos relacionados con la fermentación de un alimento, se identifican y se mantienen en el laboratorio. Cuando se requieren para la fermentación de un alimento específico, se cultivan las especies microbianas relacionadas con esta fermentación en el laboratorio y después se añaden a los sustratos. Entonces se establecen las condiciones de fermentación de tal forma que los microorganismos crezcan de preferencia para obtener un producto deseable. En la fermentación controlada, también se hace referencia a estas especies microbianas como cultivos iniciadores (Ray & Bhunia, 2010).

Un cultivo iniciador puede ser definido como una preparación microbiana de grandes números de células de al menos un microorganismo que se añaden a una materia prima para producir un alimento fermentado mediante la aceleración en la dirección y su proceso de fermentación (Ray & Joshi, 2015). Siendo adaptado al sustrato, un iniciador típico facilita un mejor control del proceso de fermentación (Holzapfel, 2002), reproducibilidad de las cualidades del producto final (Peyer et al., 2016) y aumentar su confiabilidad (Campbell-Platt, 2014).





Los cultivos iniciadores definidos garantizan una fermentación confiable y un producto con calidad consistente. El uso de cultivos iniciadores en gran escala de producción de alimentos fermentados ha llegado a ser importante para las industrias en países desarrollados, esto resulta en la mejora del control sobre el proceso de fermentación y un producto final consistente (Todorov & Holzapfel, 2015).

Según Holzapfel (1997), la introducción de cultivos iniciadores en fermentaciones tradicionales a pequeña escala debe incorporar consideraciones para la mejora de la transformación, las condiciones y la calidad del producto a través de: 1) aceleración de actividades metabólicas (acidificación o producción de alcohol); 2) procesos de fermentación mejorados y más predecibles; 3) atributos sensoriales deseables; 4) mejoramiento en la seguridad y reducción de riesgos higiénicos y toxicológicos (Holzapfel, 2002).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son los microorganismos más encontrados en alimentos fermentados. Su importancia crucial está asociada con sus características tales como son la utilización de sustrato, sus capacidades metabólicas y propiedades probióticas (Ray & Joshi, 2015). Este grupo microbiano será explicado con más detalle posteriormente.

Un número de BAL usadas como cultivos iniciadores en alimentos fermentados tienen propiedades probióticas y pueden conferir beneficios potenciales a la salud del consumidor (Todorov & Holzapfel, 2015). Se conoce que las BAL producen sustancias antimicrobianas (incluyendo bacteriocinas, ácidos orgánicos, diacetilo y sustancias de bajo peso molecular), dependiendo del sustrato en el que crecen. Esto conduce a una mayor flexibilidad y una aplicación más amplia de las BAL como cultivos iniciadores (Leroy & De Vuyst, 2004).

Cuando se consideran a las BAL como cultivo iniciador los siguientes hechos deben tomarse en cuenta (Holzapfel, 2002; Todorov & Holzapfel, 2015):



- 1) No todas las cepas de BAL tienen la misma importancia práctica y técnica en las fermentaciones alimentarias.
- 2) Los géneros *Lactobacillus* (*Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*), *Leuconostoc*, y en menor medida, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Weisella spp.* están usualmente presentes en alimentos fermentados tradicionales.
- 3) No todas las cepas de la misma especie son apropiadas como cultivos iniciadores, no todas son igualmente adaptadas al sustrato alimenticio.
- 4) Diversos procesos de fermentación ácido láctica de escala industrial están bien controlados a pesar de que son espontáneos.
- 5) El género *Bifidobacterium*, aunque filogenéticamente no está relacionado a las BAL, es a menudo agrupado como parte de ellas por sus funciones probióticas.
- 6) Con la excepción de *S. thermophilus*, las especies del género *Streptococcus* son generalmente consideradas como patógenos.

Estas son consideraciones generales, pero cada alimento fermentado cuenta con sus características propias.

### **2.3.2 Alimentos fermentados a base de cereales**

Los cereales y los productos fermentados a base de cereales son consumidos en casi todas partes del mundo (Todorov & Holzapfel, 2015). Los cereales son cultivados en más de 73% del suelo agrícola y contribuye en más del 60% de la producción del mundo; proporcionando fibra dietética, proteínas, energía, minerales y vitaminas requeridas para la salud humana (Charalampopoulos, Wang, Pandiella & Webb, 2002). Sin embargo, la calidad nutricional de los cereales es baja. Las razones son que presentan un bajo contenido de proteínas, la deficiencia de ciertos aminoácidos esenciales, la baja disponibilidad de almidón y la presencia de determinados antinutrientes (ácido fítico, taninos y polifenoles)



(Blandino, Al-Aseeri, Pandiella, Cantero & Webb, 2003); no obstante, estas características pueden ser mejoradas por medio del proceso de fermentación.

Esto es por lo tanto importante para el estudio del valor nutricional y la composición básica de sus productos, ya que los cereales son materia prima adecuada para el desarrollo de diferentes alimentos fermentados. Su perfil de macro y micronutrientes presentes lo hacen un excelente candidato para la fermentación por medio de las BAL, proporcionando los componentes necesarios para su desarrollo (Peyer et al., 2016).

Las levaduras, las bacterias ácido lácticas, los hongos o la mezcla de estos son los principales responsables para la fermentación natural a base de cereales. Los granos de cereales incluyendo el sorgo, el maíz y el mijo son sustratos comunes para la fermentación ácido láctica de atoles y bebidas conocidas por diferentes nombres, como por ejemplo el poto poto en el Congo, el Ogi en Nigeria, el koko en Ghana y el togwa en Tanzania.

En mercados especializados a través del mundo, estos productos fermentados son altamente apreciados y son considerados de valor premium por sus características de sabor y su singularidad (Todorov & Holzapfel, 2015). Además los microorganismos involucrados en estas fermentaciones tienen una influencia directa en la salud. Algunos alimentos fermentados a base de cereales han sido exitosamente comercializados, y han sido estudiados como portadores de probióticos (Ouwehand & Röytiö, 2015).

Los alimentos fermentados a base de cereales pueden ser clasificados con base a los ingredientes de cereales crudos usados en su preparación o por la textura de los productos fermentados. En términos de textura, los alimentos fermentados a base de cereales son líquidos (atoles o papillas) o geles rígidos (sólido) (Kohajdová, 2015). En este caso el atole agrio se clasificaría como un alimento fermentado líquido a base de maíz.



La fermentación de los cereales contribuye a mejorar el sabor y a reducir la actividad del ácido fítico, y de este modo mejorar la disponibilidad biológica de minerales como el hierro, que de otra forma estaría unido al ácido fítico (Ouwehand & Röytiö, 2015). La fermentación proporciona las condiciones óptimas de pH para la degradación enzimática de fitato el cual está presente en cereales en la forma de complejos con cationes polivalentes tal como hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas (Blandino et al., 2003).

La fermentación de cereales conduce también a la reducción en el nivel de carbohidratos, así como también algunos poli y oligosacáridos no digeribles, y la disponibilidad de proteínas y vitaminas del grupo B como la tiamina, riboflavina y niacina pueden ser mejoradas. Se ha reportado que en la fermentación de cereales por bacterias ácido lácticas se incrementa la concentración de aminoácidos esenciales (como lisina, metionina y triptófano) y sus derivados por proteólisis y/o síntesis metabólica (Kohajdová, 2015).

El mejoramiento en la digestibilidad del almidón durante la fermentación puede ser relacionado con las propiedades enzimáticas de la microbiota fermentadora que lleva a cabo la ruptura de los oligosacáridos del almidón. Generalmente las enzimas llevan a cabo la escisión de la amilosa y amilopectina a maltosa y glucosa. Similarmente un mejoramiento en la digestibilidad de las proteínas de productos fermentados es principalmente asociado con un incremento en la actividad proteolítica de su microbiota fermentadora (Kohajdová, 2015).

Además de los beneficios y ventajas ya mencionados, durante la fermentación de cereales se forman varios compuestos volátiles, los cuales contribuyen a formar una mezcla compleja de sabores en los productos; de esta forma, el proceso de fermentación conduce a un mejoramiento general en textura, sabor y aroma de los productos finales (Kohajdová, 2015).



**Cuadro 2.3.2.1. Algunos productos fermentados tradicionales a base de cereales consumidos en Europa, África y América Latina que pueden ser consumidos en un estado crudo o parcialmente cocido y que contienen microorganismos vivos.**

Producto	Materia prima/ sustrato	Propiedad sensorial y naturaleza	Microorganismos	País
Abreh	Sorgo	Estado sólido y sumergido	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sudán
Ben-saalga	Mijo perla	Alimento infantil	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Weissella</i> sp., levaduras	Burkina Faso, Ghana
Boza	Cereales (cebada, avena, mijo, maíz, trigo, arroz)	Líquido agrio refrescante	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus coprophilus</i> ,* <i>Lactobacillus coryniformis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus sanfrancisco</i> ,** <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc oenos</i> (reclasificado como <i>Oenococcus oeni</i> ), <i>Leuconostoc raffinolactis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bulgaria, Península de los Balcanes
Burukutu	Sorgo y mandioca	Cre moso, líquido	<i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces chavelieri</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Acetobacter</i> sp.	Nigeria
Busa	Maíz, sorgo, mijo	Sumergido	<i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus damnosus</i>	Este de África, Kenia
Chicha de jora	Maíz	Bebida ligeramente alcohólica	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>	América Latina
Dégué	Mijo	Condimento	<i>Lactobacillus gasserii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Enterococcus</i> sp.	Burkina Faso
Enjera	Harina de teff, trigo	Ácido, masa fermentada, leudado, pan como hotcake, alimento básico	<i>Lactobacillus pontis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i>	Etiopía
Hussuwa	Sorgo	Masa cocida	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> , levaduras	Sudán
Kenkey	Maíz	Ácido, sólido, empanada al vapor, alimento básico	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Candida mycoderma</i>	Ghana
Kishk	Trigo, leche	Bebida refrescante	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , levaduras	Egipto
Kisra	Sorgo	Panecillo fino, alimento básico	<i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus confusus</i> ,*** <i>Lb. brevis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Erwinia ananas</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp.	Sudán



Producto	Materia prima/ sustrato	Propiedad sensorial y naturaleza	Microorganismos	País
<b>Koko</b>	Maíz	Atole	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Cand. mycoderma</i>	Ghana
<b>Maheu</b>	Maíz, sorgo, mijo	Bebida refrescante	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Sudáfrica
<b>Mahewu</b>	Maíz	Bebida refrescante	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>	Sudáfrica
<b>Mawe</b>	Maíz	Producto intermedio utilizado para preparar bebidas, atole	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lactobacillus confusus</i> ,*** <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Benin, Togo
<b>Mbege</b>	Maíz, sorgo, mijo	Sumergido	<i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Tanzania
<b>Ogi</b>	Maíz, sorgo, mijo	Ligeramente ácido, atole viscoso, alimento básico	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus pantheris</i> , <i>Lactobacillus vaccinostercus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Aerobacter</i> sp., <i>Cand. mycoderma</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Cephalosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Nigeria
<b>Pito</b>	Maíz, sorgo, mijo	Sumergido	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Candida</i> sp.	África occidental
<b>Poto (atole)</b>	Maíz	Lechoso	<i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. plantarum/paraplantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., levaduras	Congo
<b>Pozol</b>	Maíz	Ligeramente ácido, espeso, atole viscoso, alimento básico	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> , <i>Agrobacterium azotophilum</i> , <i>Alkaligenes pozolis</i> , <i>Escherichia coli</i> var. <i>napolitana</i> , <i>Pseudomonas mexicana</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Saccharomyces</i> sp., hongos <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus graveolus</i> y las levaduras <i>Torulopsis inconspicua</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i> y <i>Candida queretana</i>	México
<b>Tepache</b>	Maíz, piña, manzana, naranja			México
<b>Togwa</b>	Mandioca, maíz, sorgo, mijo	Bebida o atole fermentado	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> y <i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>	Tanzania
<b>Uji</b>	Maíz, sorgo, mijo, harina de mandioca	Ácido, atole agrio, alimento básico	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Kenia, Uganda, Tanzania

\*Probablemente Syn. de "*Lactobacillus confusus*", que más tarde pasó a llamarse *W. confusa*;

\*\**Lactobacillus sanfranciscensis*; \*\*\*Renomabrada *W. confusa*. Fuente: Todorov & Holzapfel, 2015.



## 2.4 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo microbiano cuyos miembros poseen similitudes morfológicas, metabólicas y fisiológicas, forman un grupo filogenético por lo que están relacionadas cercanamente (Khalid, 2011). El término de bacterias ácido lácticas emerge hasta el inicio del siglo XX y se describe como un grupo heterogéneo de bacterias que son actualmente definidas como cocos o bacilos, Gram-positivo, catalasa negativo, inmóviles, no esporuladas, anaerobias, aerotolerantes y productoras de ácido láctico (principal metabolito generado durante la fermentación de azúcares) (Muñoz, Moreno-Arribas & Rivas, 2011).

Su nombre deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal (y a veces único) producto final (Stainer, Ingraham, Wheelis & Painter, 1992). Las bacterias ácido lácticas están generalmente asociadas con hábitats ricos en nutrientes, como varios productos alimenticios (leche, carne, bebidas, vegetales), pero algunas son también miembros de la microbiota normal de la boca, intestino y vagina de los mamíferos (Axelsson, 1998).

La mayoría de las bacterias ácido lácticas son inocuas para la especie humana y, además sus productos metabólicos aportan un sabor agradable a los alimentos. Estas propiedades permiten utilizarlas para preparar y conservar alimentos (Ingraham et al., 1998). Las BAL juegan un papel importante en la bioconservación de los alimentos, son seguras para el consumo (GRAS: “generalmente reconocido como seguro”) como se ha demostrado por su larga historia de su uso seguro en alimentos, y llegan a ser rápidamente la microbiota dominante durante la fermentación dirigida o espontánea y persisten durante el almacenamiento de los alimentos fermentados (Corsetti et al., 2015).



Se ha reportado que las BAL pueden contribuir a la seguridad microbiológica y/o proporcionar una o más ventajas tecnológicas, nutricionales y organolépticas para un producto fermentado a través de la producción de etanol, ácido acético, compuestos aromáticos, exopolisacáridos, bacteriocinas y varias enzimas (Leroy & De Vuyst, 2004). Las BAL en los alimentos fermentados son de interés no sólo por su papel en la fermentación sino también por su papel en la promoción de efectos positivos en la salud (Nuraida, 2015). El concepto de efectos benéficos a la salud de las BAL ha existido desde 1908, cuando Metchnikoff propuso que la producción de ácido por organismos en los productos lácteos fermentados podría prevenir obstrucciones en el intestino grueso y así conducir a la prolongación del periodo de vida del consumidor (Heller, 2001).

El ácido láctico presenta varios efectos benéficos en la elaboración de un alimento fermentado: por un lado, posee efecto bacteriostático y bactericida sobre bacterias patógenas o alterantes, mejorando la seguridad y alargando la vida media del producto; por otro lado, contribuye a las características organolépticas finales, como la textura o el sabor (Rodríguez, 2006). Los alimentos complementados con BAL ayudan a la buena digestión, al fortalecimiento del sistema inmune, a la reducción del nivel de colesterol en la sangre, así como a una mejor tolerancia a la lactosa. El consumo de bacterias lácticas como parte de la dieta permite el restablecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal (Guadarrama, 2007).

Tradicionalmente la clasificación de las bacterias ácido lácticas en diferentes géneros ha estado en gran parte basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad para crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a condiciones ácidas o alcalinas (Khalid, 2011). Actualmente se basa en la comparación de secuencias, sobre todo del gen ribosomal 16S, aunque se usan también otros genes.





Las bacterias ácido lácticas son quimiotrófas, ellas obtienen la energía requerida para todo su metabolismo desde la oxidación de compuestos químicos. La oxidación de azúcares constituye la principal vía de producción de energía (Khalid, 2011).

#### **2.4.1 Metabolismo de carbohidratos en las BAL**

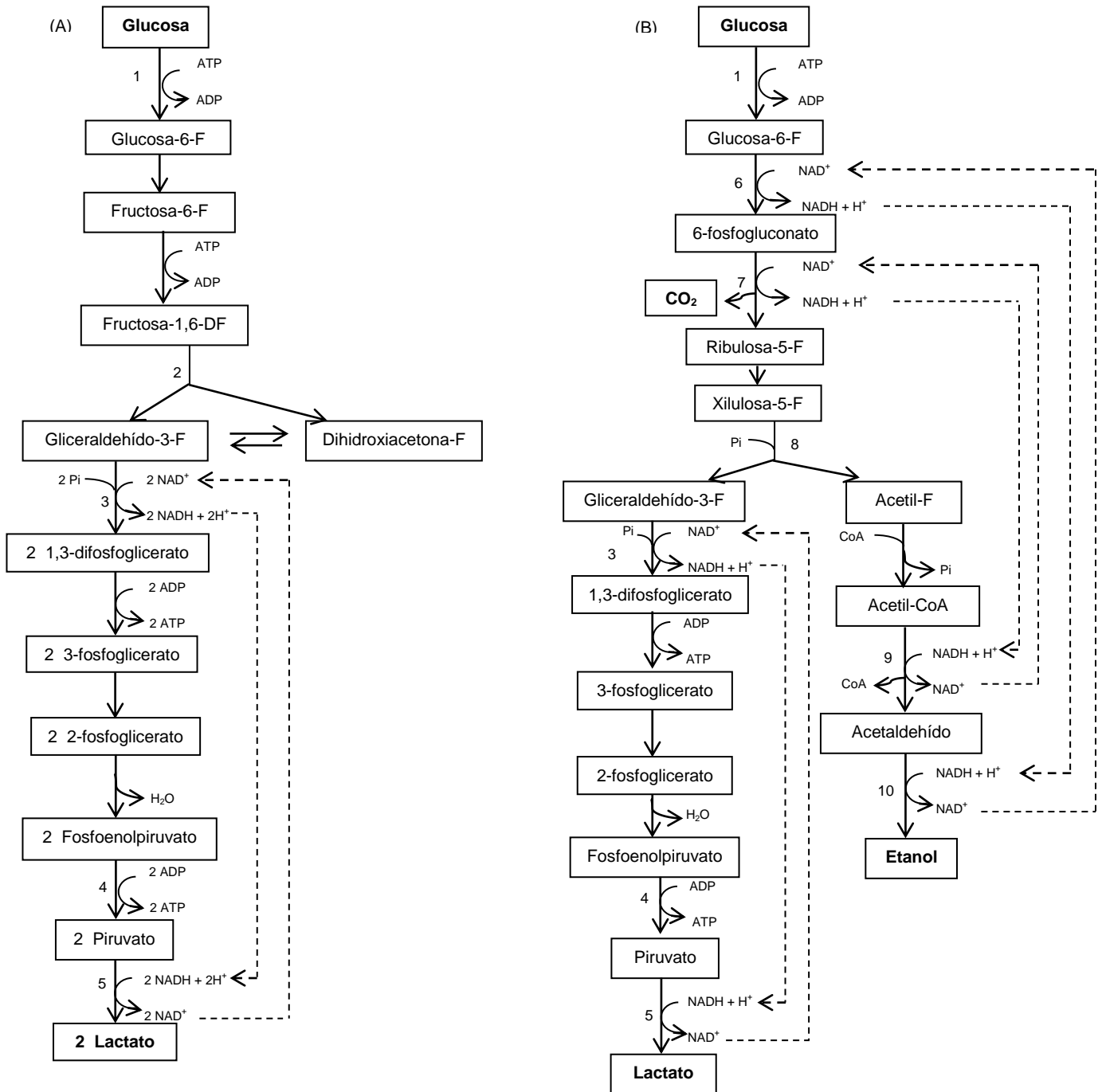
Los miembros de las BAL pueden ser subdivididos en dos grupos distintos basados en su metabolismo de carbohidratos. El grupo de las homofermentativas está compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunos *Lactobacillus*, usan la vía de la Glucólisis Embden-Meyerhof-Parnas para convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de lactato (Ray & Joshi, 2015) y una ganancia neta de 2 ATP (Axelsson, 1998). Las bacterias homofermentativas transforman casi todos los azúcares utilizados, especialmente glucosa en ácido láctico (Khalid, 2011) y poseen la enzima aldolasa (Ramírez, Rosas, Velázquez, Ulloa & Arce, 2011). La vía homofermentativa incluye una primera fase de todas las reacciones de la glucólisis, mediante las cuales se obtiene una hexosa a partir de piruvato. El aceptor terminal de electrones en esta vía es el piruvato el cual es reducido a ácido láctico (Khalid, 2011).

En contraste, las bacterias heterofermentativas, convierten hexosas a pentosas (Ramírez et al., 2011) y producen cantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol desde glucosa usando la vía de las hexosas-monofosfato o vía de las pentosas (Ray & Joshi, 2015), o también llamada la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (Axelsson, 1998). Las bacterias heterofermentativas solamente generan la mitad de la energía (Parra, 2010); es decir 1 ATP/glucosa (Axelsson, 1998) y esta vía ocurre en el citosol (Khalid, 2011). Los miembros de este grupo incluyen a *Leuconostoc*, *Weissella* y algunos *Lactobacillus* (Ray & Joshi, 2015).



La glucólisis es caracterizada por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP), el cual es transformado por una FDP aldolasa en dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). GAP (y DHAP vía GAP) es entonces convertido a piruvato en una secuencia metabólica incluyendo una fosforilación a nivel de sustrato en dos sitios. Bajo condiciones normales, por ejemplo, exceso de azúcar y un limitado acceso de oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico por un NAD<sup>+</sup> dependiente de la lactato deshidrogenasa (nLDH), de este modo reoxidando, se forma el NADH. El ácido láctico es virtualmente el único producto final, y el proceso metabólico es referido como una fermentación homoláctica (Axelsson, 1998).

La otra vía principal de fermentación ha sido designada como la vía de las pentosas fosfato, la vía de la pentosa fosfocetolasa o la vía hexosa-monofosfato. Sin embargo esta ha sido referida como la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK). Esta es caracterizada por un paso de deshidrogenación inicial con la formación de 6-fosfogluconato, seguido por una descarboxilación. La pentosa-5-fosfato es dividida por la fosfocetolasa en GAP y acetilfosfato. El GAP finalmente se transformará en ácido láctico. Cuando no está disponible un aceptor de electrones, el acetilfosfato es reducido a etanol y acetaldehído por la vía de la acetil CoA. Este metabolismo conduce a cantidades significativas de otros productos finales (CO<sub>2</sub>, etanol) en adición al ácido láctico, esta es referida como una fermentación heteroláctica (Axelsson, 1998).



(A) **Fermentación Homoláctica;** (B) **Fermentación Heteroláctica.** Numeración de enzimas empleadas: 1. glucocinasa; 2. fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 3. gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 4. piruvatocinasa; 5. lactato deshidrogenasa; 6. glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 7. 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 8. fosfoacetolasa; 9. acetaldehído deshidrogenasa; 10. alcohol deshidrogenasa.

Fuente: Axelsson, 1998.

**Figura 2.4.1.1 Principales vías de fermentación de la glucosa.**



## 2.4.2 Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas

La acción de conservación de los alimentos de las bacterias ácido lácticas contra microorganismos patógenos es debido a la producción de varios compuestos antimicrobianos que resultan de la fermentación. Estos compuestos formados se enlistan en el cuadro 2.4.2.1.

**Cuadro 2.4.2.1. Productos metabólicos de bacterias ácido lácticas con propiedades antimicrobianas.**

Producto	Principales organismos objetivo
<b>Ácidos orgánicos</b>	
Ⓢ <b>Ácido láctico</b>	-Bacterias Gram-negativas y de descomposición, algunos hongos
Ⓢ <b>Ácido acético</b>	-Bacterias de putrefacción, Clostridium, algunas levaduras y hongos
<b>Peróxido de hidrógeno</b>	-Patógenos y organismos de descomposición, especialmente en alimentos ricos en proteína
<b>Enzimas</b>	
Ⓢ <b>Sistema lactoperoxidasa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-Patógenos y bacterias de descomposición (leche y productos lácteos)
Ⓢ <b>Lisozima</b> (por tecnología recomb. ADN)	-Bacterias Gram-positivas indeseables
<b>Metabolitos de bajo peso molecular</b>	
Ⓢ <b>Reuterina</b> (3-OH-propionaldehído)	-Amplio espectro de bacterias, hongos y levaduras
Ⓢ <b>Diacetilo</b>	-Bacterias Gram-negativas
Ⓢ <b>Ácidos grasos</b>	-Diferentes bacterias
<b>Bacteriocinas</b>	
Ⓢ <b>Nisina</b>	-Algunas BAL y bacterias Gram-positivas, en particular formadoras de endosporas
Ⓢ <b>Otras</b>	-Bacterias Gram-positivas, espectro inhibitor de acuerdo con la cepa productora y el tipo bacteriocina

Fuente: Holzapfel, Geisen & Schillinger, 1995.



## 2.5 Alimentos fermentados de México

Actualmente existen en el mundo una gran variedad de bebidas y alimentos fermentados. Sin embargo la mayoría de los productos fermentados conocidos hasta la fecha son considerados alimentos tradicionales que se producen y consumen en forma regional, no se conocen fuera de su lugar de origen, son componentes importantes de la dieta de muchos grupos étnicos de diversas partes del mundo y forman parte de un acervo cultural (Calderón-Villagómez, 1993).

Las bebidas y los alimentos fermentados mexicanos pueden ser clasificados de acuerdo con las materias primas que se utilizan en su preparación y con base en su composición química. En términos generales, puede hacerse una distinción entre los productos fermentados alcohólicos y los no alcohólicos; siguiendo otro enfoque, estos pueden ser divididos en dos grupos: autóctonos o indígenas y alóctonos o de origen extranjero, aunque esta clasificación no siempre está bien delimitada porque existen varias modalidades en ambos tipos, de manera que es posible considerar bebidas y alimentos fermentados distintos a los originales o de tipo mixto, especialmente elaborados por poblaciones mestizas, a menudo con características intermedias entre los tipos indígenas y los introducidos (Herrera, 1993).

En México se elaboran actualmente o en épocas pasadas, mediante procesos de fermentación, numerosos alimentos y bebidas; tanto autóctonos como alóctonos, aunque sólo algunos han llegado a alcanzar una gran aceptación en zonas amplias del país, pues muchos de estos están restringidos a pequeñas extensiones territoriales en relación a factores ecológicos y a las predilecciones de determinados grupos étnicos por ciertos alimentos, cuyo consumo se vuelve rutinario y llega a ser tradicional. Algunos productos autóctonos de este tipo son los *atoles agrios* de maíz, que en sus diversas modalidades son muy apreciados en algunas partes del centro y sur de México (Herrera, 1993).



En México, el maíz es consumido primordialmente en forma de tortillas, aunque también es utilizado por diversos grupos étnicos como materia prima para la elaboración de alimentos y bebidas fermentados, que son consumidos con fines de alimentación religiosos, estimulantes y medicinales. Es indudable que los alimentos fermentados de maíz han sido y seguirán siendo consumidos por mucho tiempo por grandes núcleos de población de México y otros países latinoamericanos, que tienen al maíz como materia prima principal para su alimentación (Cruz & Ulloa, 1973).

En la actualidad de toda la variedad de bebidas y alimentos fermentados existentes en nuestro país, sólo algunos han sido objeto de investigaciones étnicas, antropológicas, sociales, microbiológicas y químicas (cuadro 2.5.1) (Calderón-Villagómez, 1993). La elaboración de estos productos está basada en recetas que han sido transferidas por generaciones, y en su proceso de fermentación intervienen microorganismos, principalmente levaduras y bacterias, que la mayoría de las veces producen, por medio de enzimas, cambios favorables en el producto final (Valderrama & Ramírez, 1993).



**Cuadro 2.5.1. Bebidas fermentadas de maíz que han sido consumidas o que se consumen en varios lugares de México.**

Nombre	Tipo de alimento	Grupo indígena	Estados
<b>Agua agria</b>	Bebida no alcohólica	Nahuas	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.
<b>Atole</b>	Bebida no alcohólica	Chichimeca-jonaz	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca y Guanajuato.
<b>Atole agrio</b>	Bebida no alcohólica	Mazatecos	Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala Michoacán y Jalisco.
<b>Pozol</b>	Bebida no alcohólica	Zapotecos, Zoques, Lacandones, Mayas, Tzotziles, Tzeltales, Tojolabales, Mames, Chontales de Tabasco	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y el Territorio de Quintana Roo.
<b>Sendechó o sénde</b>	Bebida alcohólica	Mazahuas	Estado de México, Michoacán.
<b>Tepache</b>	Bebida alcohólica	Pápagos, Triques, Mixtecos, Amuzgos, Chinantecos	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Sonora y Chiapas.
<b>Tesgüino</b>	Bebida alcohólica	Zapotecos, Pimas, Yaquis, Tarahumaras, Tepehuanos, Huicholes	Oaxaca, Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco y Durango.

Fuente: Cruz & Ulloa, 1973



### 2.5.1 Atoles fermentados de maíz

En Cuetzalan, además de consumir el maíz en la tortilla, existe la costumbre de tomar atoles y algunas aguas a base de maíz seco, tostado, germinado y fermentado. Los atoles de masa, textiatol y los de nixtamal, nixtalatol se consumen en la vida diaria alternando con el café; mientras que en las fiestas o ceremonias rituales se reparte, a veces, atole fermentado: xokoatol o axokot. El atole de masa se puede tomar solo y en frío como refresco; sin dulce es buen remedio para la “cruda” xokomiki o también, para las personas que tienen “el estómago caliente” (Valderrama & Ramírez, 1993).

En este mismo lugar se preparan con maíz fermentado tres clases de atole (Valderrama & Ramírez, 1993):

- ∞ Xokoatol. Se elabora con maíz martajado en metate y fermentado en una olla durante una noche cerca del fogón (aproximadamente 15 horas). Esta pasta fermentada se repasa en el metate y se agrega a una olla que contiene atole de masa, enseguida, la mezcla se endulza con piloncillo, se calienta y se mueve constantemente hasta que espese. Este atole se toma frío o tibio, y se acostumbra tomar en las celebridades de semana santa. El sabor de este atole es agridulce, parecido al del tamarindo.
  
- ∞ Eloatol. Atole de maíz tierno fermentado, sólo se prepara en el tiempo que aparecen los primeros elotes de la milpa. Se muele en metate el maíz tierno, después se pone en una olla, se bate a mano y se cuela. Para fermentar este maíz se deja en la olla junto al fogón durante medio día, luego se le agrega panela y se cuece hasta quedar espeso.





∞ Axokot. Agua agria, es de color verdoso debido a que el fermentado de maíz se mezcla con una hierba conocida como axokoxiuit “la hierba del axokot”; o tsopekixiuit “hierba dulce” (*Lippia dulcis*), la cual da un sabor dulce al preparado. El axokot se prepara en un cántaro de boca ancha que solo se destina a este fin, axokokomit. Para hacer el axokot primero se cocina un atole de masa y se calientan dos ollas de agua caliente, la hierba se muele con un poco de cal y se unta al interior del cántaro. Luego, se vierte el atole de masa en el cántaro y las dos ollas de agua hirviendo, además, se meten cuatro brazas ardiendo con el fin de evitar que “le hagan ojo” al axokot.

Para lograr un buen fermentado se tapa el cántaro con hojas verdes de plátano y se coloca sobre una cama de hojas secas y costales que también llegan a cubrir los costados hasta lograr una cubierta térmica. El axokot requiere unas 20 horas de fermentación. Tiene una consistencia aguada y puede tomarse frío como refresco.

∞ Por otro lado en el estado de Tabasco diversos grupos indígenas y mestizos consumen una bebida regional ácida, no alcohólica preparada con una masa elaborada con maíz de dobla, fermentado y no nixtamalizado, que se conoce como atole agrio. Este atole se elabora únicamente en el periodo de dobla, en los meses de mayo y septiembre. El proceso de elaboración consiste en cosechar el maíz, desojar y desgranar las mazorcas, moler los granos, formar las bolas de masa en el caso de la fermentación sólida o mezclar el agua y la masa si se realiza la fermentación líquida (Valderrama, 2012).

En el estudio realizado anteriormente por Valderrama (2012) se encontró que las características en los atoles elaborados fueron presentar color blanco, sabor ácido, textura granulada y consistencia espesa. Tradicionalmente, es consumido por mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en el periodo de lactancia, ya que se cree que este aumenta la cantidad de leche que se produce, así mismo los habitantes de la comunidad le atribuyen una mejora a la salud cuando se padece de diarrea.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los cereales tienen un alto valor nutritivo y son consumidos en todas partes del mundo, además de que son un sustrato adecuado para la producción de alimentos fermentados ya que proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de bacterias lácticas principalmente, que pueden presentar una acción benéfica para la salud de los humanos. Los alimentos fermentados abarcan alrededor de un tercio de los alimentos consumidos a nivel mundial y son considerados como alimentos funcionales, ya que proporcionan beneficios a la salud. Por otro lado el uso de cultivos iniciadores acelera y facilita el control en el proceso de fermentación, y además se obtiene mayor reproducibilidad en las cualidades del producto final.

Uno de los alimentos fermentados a base de maíz es el atole agrio, el cual es consumido tradicionalmente en las regiones del sureste de México. El atole agrio de dobla de Villahermosa, Tabasco, se elabora con maíz tierno o de dobla; sin embargo su obtención es difícil, ya que es estacional y su disponibilidad depende de las condiciones del clima. Se decidió entonces trabajar con maíz disponible en la Ciudad de México utilizando dos cepas de bacterias lácticas como cultivo iniciador para llevar a cabo el proceso de fermentación.

Las bacterias ácido lácticas contribuyen a la conservación de los alimentos por medio de la producción de sustancias antimicrobianas; además mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura de los productos y hasta en ocasiones aumentan su calidad nutritiva. También proporcionan ventajas para la salud de sus consumidores, como la capacidad probiótica, que resulta benéfica para el organismo. Esto proporciona una mayor flexibilidad y una ventaja más amplia para la aplicación de bacterias lácticas como cultivos iniciadores.



#### 4. HIPÓTESIS

Si las cepas seleccionadas crecen y se desarrollan en presencia de la microbiota natural del sustrato, se logrará obtener un producto similar al atole agrio tradicional con relación a sus características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales mediante el uso de un cultivo iniciador en el proceso de fermentación.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 Objetivo general

Determinar la posibilidad de obtener atole agrio a partir de cultivos puros de las cepas de *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) en condiciones controladas.

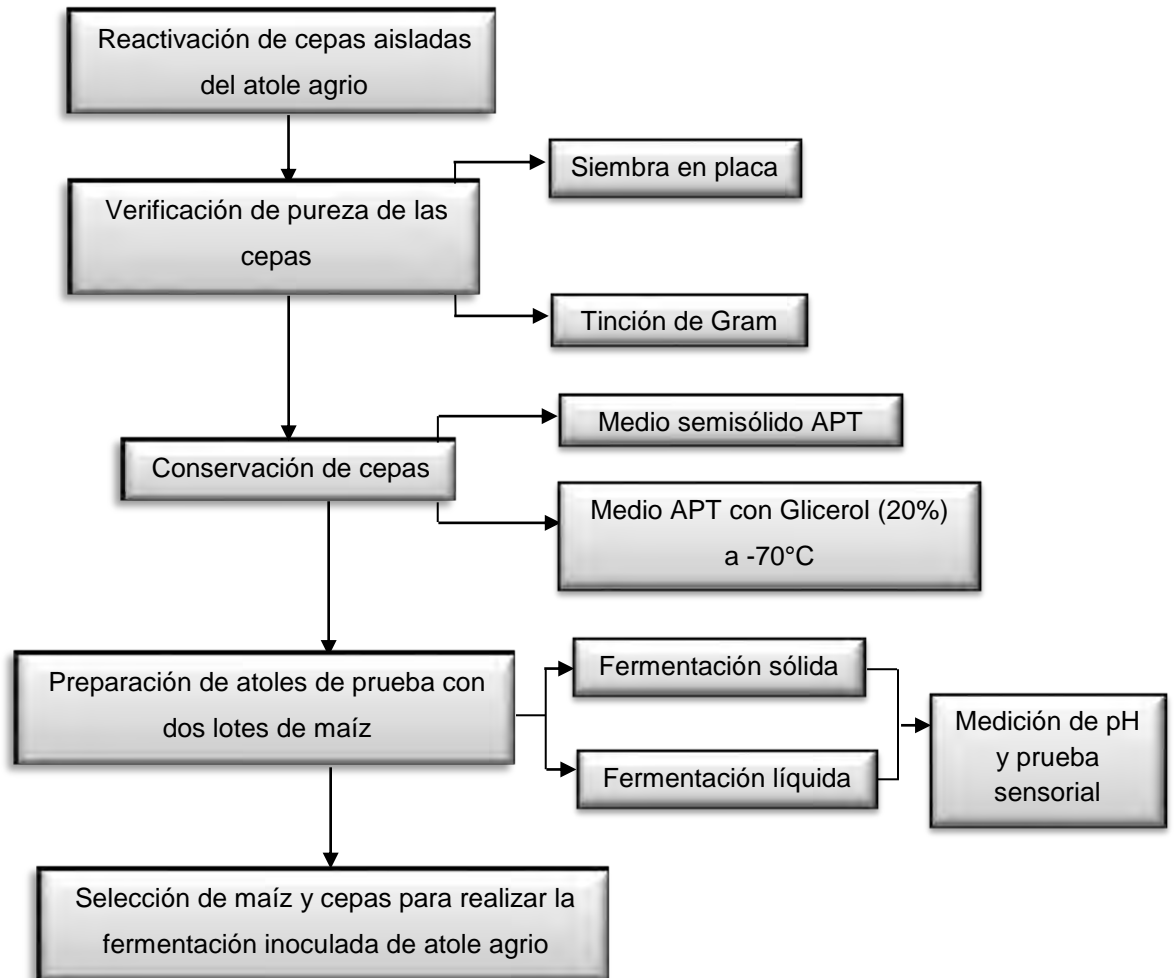
##### 5.2 Objetivos particulares

- ∞ Comparar el efecto de emplear un cultivo iniciador mediante la medición de diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos durante la fermentación.
  
- ∞ Determinar si los atributos sensoriales generados en el atole agrio en el proceso de fermentación inoculada con cultivos puros y mixtos de bacterias lácticas son similares a los de la fermentación natural.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### ∞ Etapa 1





∞ Etapa 2

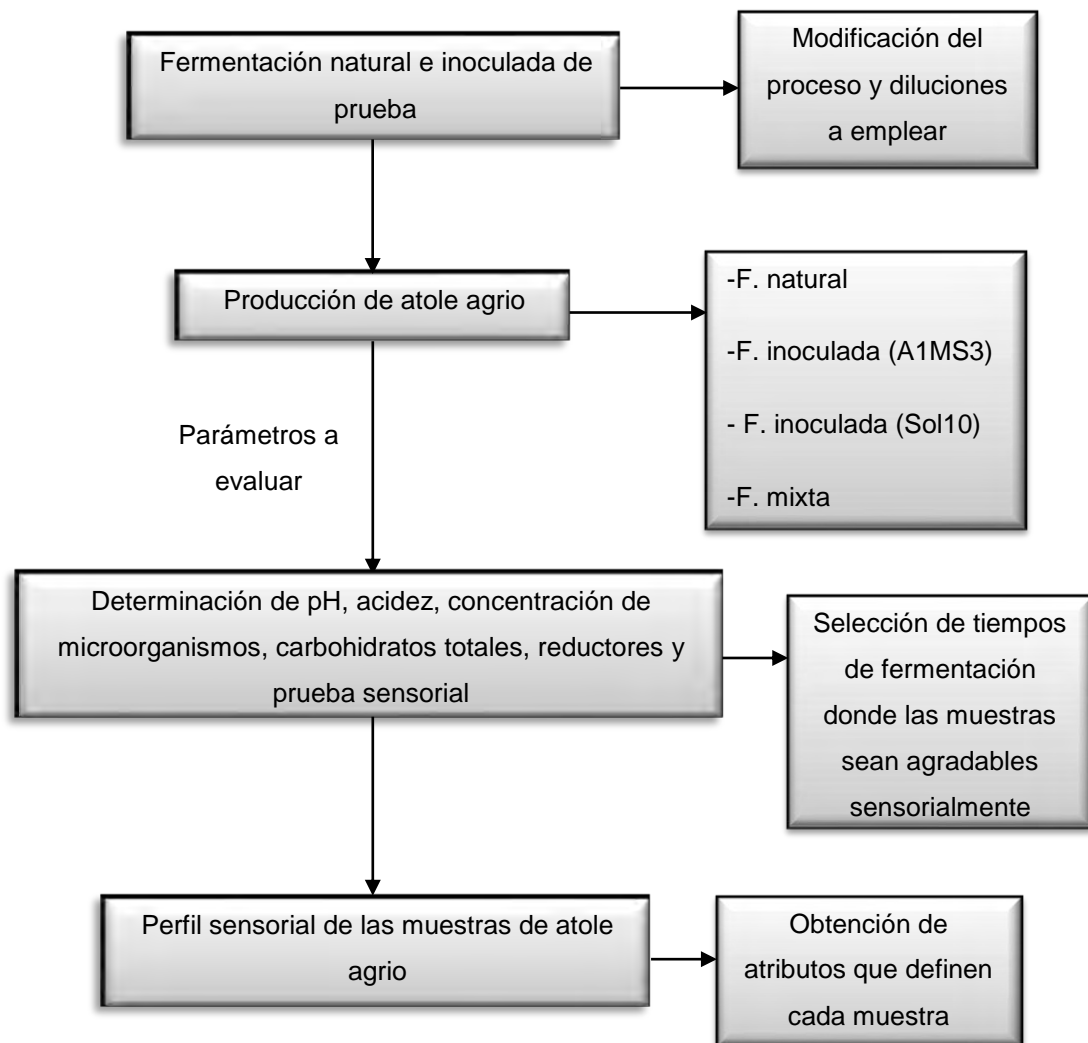


Figura 6.1. Plan de los experimentos (Etapa 1 y 2)



## 6.1 Reactivación, verificación de pureza y conservación de cepas aisladas del atole agrio

Las cepas que se aislaron anteriormente del atole agrio y fueron identificadas por Vâkevâinen et al., (comunicación personal); se encontraban almacenadas en caldo MRS con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  y fueron reactivadas en caldo APT, medio utilizado para el cultivo de bacterias del ácido láctico (Muntaner, 1981).

**Cuadro 6.1.1. Cepas de bacterias lácticas aisladas del atole agrio (Valderrama, 2012).**

Clave de la cepa	Especie
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	<i>Lactococcus lactis</i>
11	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
A1MM10	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Sol10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
A1MS3	<i>Lactococcus lactis</i>

Para comprobar la pureza de las cepas se sembraron en placas con medio MRS Difco <sup>TM</sup>; base para el aislamiento, enumeración y cultivo de lactobacilos, y se observó la morfología macroscópica a las 24 horas de crecimiento. Una vez identificado solo un tipo de colonias en las placas se realizó una tinción de Gram para cada una de las cepas sembradas y se observó su morfología microscópica (Koneman et al., 2008). Por último se realizó su conservación en medio semisólido APT y en medio APT con glicerol al 20% a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 6.2 Preparación de atoles de prueba

Se emplearon dos diferentes lotes de maíz seco de color amarillo homogéneo, de tamaño mediano, con forma redondeada y aplanada; adquiridos en el mercado de Santo Domingo de la Ciudad de México y se prepararon los atoles llevando a cabo dos tipos de fermentación; líquida y sólida para cada uno de los maíces respectivamente.



Se elaboró una propuesta para la preparación de atole agrio, con base en el procedimiento reportado en un estudio anterior (Valderrama, 2012) y el reporte de estancia “Estudio de la fermentación láctica dirigida del atole agrio de Villahermosa, Tabasco” de Karla Torres, 2015. De acuerdo con estos procedimientos se realizó el siguiente proceso:

- 1) Se limpiaron los dos lotes de maíz.
- 2) Se pesaron 300 gramos de cada uno y se dejaron remojando en 600 mL de agua purificada; relación maíz:agua 1:2 (m/v), durante 20 horas.
- 3) Una vez transcurrido el tiempo de remojo, el maíz se dejó escurrir y se molió con un molino manual.

Para la fermentación sólida:

- 4) De cada tipo de maíz molido se pesaron 200 gramos.
- 5) Se adicionaron entre 80 y 90 mL de agua purificada Epura al maíz molido y se formaron bolas de masa que se colocaron en un recipiente de plástico.
- 6) Las bolas formadas se cubrieron con gasa y se dejaron fermentar a 30°C por 18 horas.

Para la fermentación líquida:

- 7) De cada tipo de maíz molido se pesaron 100 gramos.
- 8) Se suspendió el maíz molido en 200 mL de agua purificada Epura; relación masa:agua 1:2 (m/v) hasta su completa incorporación.
- 9) Las muestras se colocaron en un recipiente de plástico, se cubrieron con gasa y se dejaron fermentar a 30°C por 18 horas.

Al término de la fermentación:

- 10) A las muestras de la fermentación sólida en conjunto se les agregaron 500 mL de agua purificada Epura, mientras que a las muestras de la fermentación líquida se les agregaron entre 100 y 200 mL según la cantidad que quedara de la fermentación.



- 11) Se calentaron (sin llegar a ebullición) los atoles de cada lote de maíz y de cada fermentación, hasta obtener una consistencia más espesa, similar a la de una atole. El tiempo requerido fue de 3 hasta 8 minutos.

El parámetro analizado fue la medición de pH (experimentos preliminares) con el uso de un potenciómetro (Oakton pH 700). Para la fermentación líquida se tomaron 5 mL de la muestra, mientras que para la fermentación sólida se tomaron 5 gramos y se disolvieron en 10 mL de agua para hacer la medición de pH respectivamente.

### **6.3 Selección de maíz y cepas a utilizar para realizar la fermentación inoculada de atole agrio.**

Una vez realizadas las mediciones de pH, se analizaron los atributos sensoriales de las muestras preparadas con ambos lotes de maíz. Se realizaron fermentaciones líquidas y sólidas. Se decidió trabajar con el maíz 1 (Figura 6.3.1), y realizar la fermentación líquida con el uso de dos cepas diferentes; *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), cepas que fueron utilizadas por Vâkevâinen et al., (comunicación personal) en un proyecto paralelo en Finlandia.



**Figura 6.3.1. Maíz seleccionado para la producción de atole agrio**



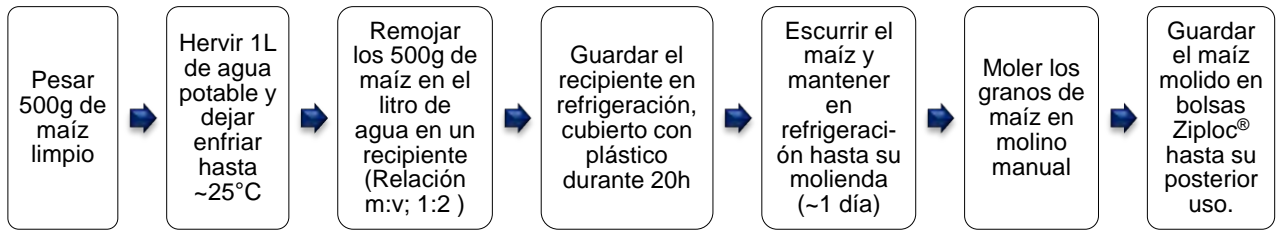


## 6.4 Fermentación natural e inoculada de prueba y producción de atole agrio

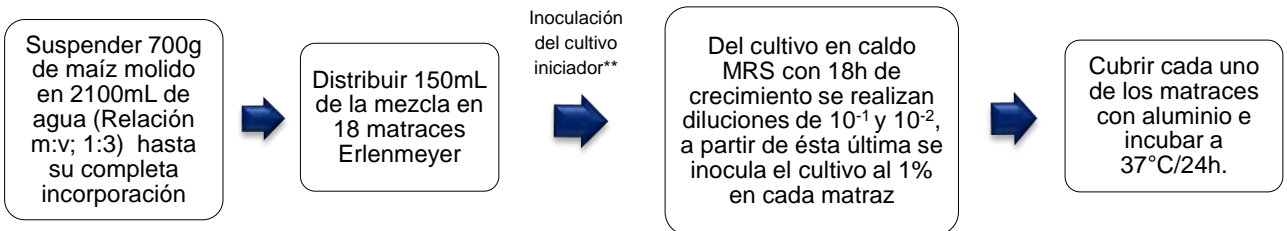
Se realizó un primer ensayo de la fermentación natural y la fermentación inoculada con *L. lactis* (A1MS3), donde según los resultados obtenidos se hizo una modificación a la elaboración del atole de acuerdo con el procedimiento que se había reportado en un estudio anterior (Valderrama, 2012). Para la preparación de un lote se pesaron 750 g de maíz limpio, posteriormente se hirvieron 1.5 L de agua potable; relación 1:2 (m:v), se dejó enfriar y se dejó remojar el maíz en el agua previamente hervida en un recipiente cubierto con plástico durante 20 horas y en condiciones de refrigeración (7°C). Posteriormente se escurrió el agua en la que se había remojado el maíz, se cubrió nuevamente con plástico y se mantuvo en refrigeración por un día más. Por último se molió el maíz con un molino manual y se guardó en bolsas Ziploc<sup>®</sup>, hasta su posterior uso.

Para realizar las fermentaciones natural e inoculada, se prepararon 12 matraces con 150 mL de volumen (maíz + agua), donde se suspendieron 700 g de maíz molido en 2100 mL de agua potable estéril; relación 1:3 (m:v) hasta su completa incorporación. Una vez preparado el atole se distribuyó en los 12 matraces estériles; 6 de ellos fueron empleados para la fermentación natural; es decir donde no se inoculó ninguna cepa, y en el resto se realizó la inoculación de la cepa de *Lactococcus lactis* (A1MS3). La inoculación del cultivo iniciador se realizó al 1% del volumen total de la mezcla de maíz y agua en cada matraz; esto en los 6 de los matraces y todos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizaron mediciones de pH, acidez, concentración de microorganismos y concentración de carbohidratos totales y reductores a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas de fermentación.

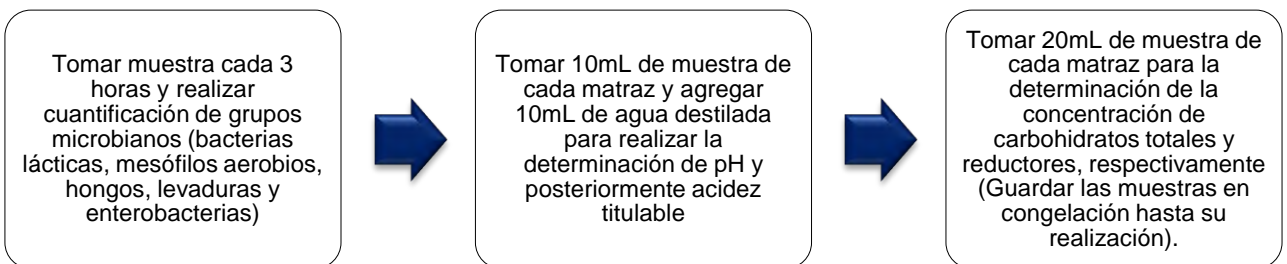
Según los resultados obtenidos de la cuantificación de microorganismos se realizaron modificaciones a las diluciones empleadas en los diferentes medios de cultivo a utilizar. El diagrama final para la preparación de atole agrio por triplicado para cada tipo de fermentación es el que se presenta en la Figura 6.4.1.



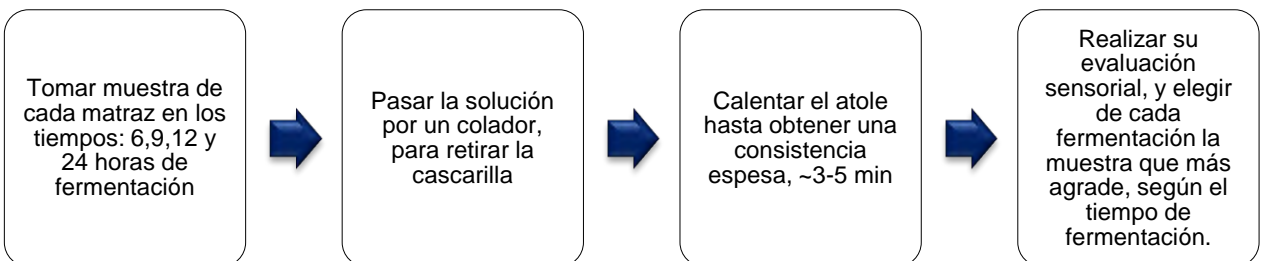
\*Fermentación Líquida (Preparación de 18 matraces con 150 mL cada uno: maíz + agua)



- Medición de pH, acidez titulable, cuantificación de microorganismos y concentración de carbohidratos totales y reductores



- Prueba sensorial



\*\*Para el caso de la fermentación natural no se realiza el paso de la inoculación del cultivo iniciador.

Figura 6.4.1. Diagrama para producción de atole agrio y parámetros a evaluar.



Figura 6.4.2. Molienda del maíz con molino manual



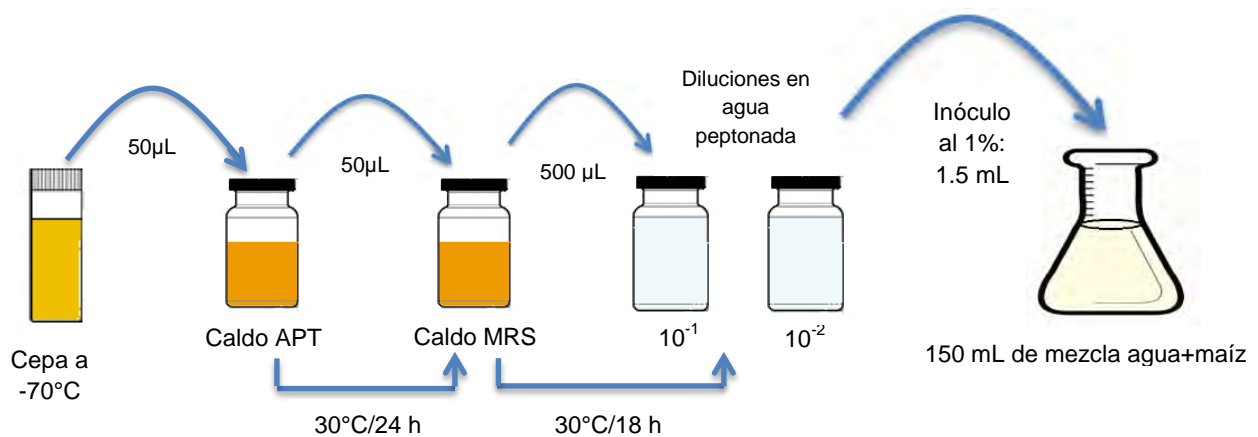
Figura 6.4.3. Muestras de atole agrio después de las 24 horas de fermentación

Matraz A: atole agrio inoculado con *L. lactis* (A1MS3), matraz B: atole agrio inoculado con *P. pentosaceus* (Sol10) y matraz C: atole agrio obtenido por fermentación natural.



Para realizar la inoculación del cultivo iniciador; ya sea con *Lactococcus lactis* (A1MS3) o *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), se llevó a cabo la reactivación de la cepa que fue conservada en medio APT con glicerol al 20% a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para esto se agitó el microtubo en el vortex, se tomaron  $50\ \mu\text{L}$  del cultivo y se colocaron en un vial con 5 mL de caldo APT estéril, se agitó nuevamente y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Posteriormente se tomaron nuevamente  $50\ \mu\text{L}$  del cultivo anterior y se colocaron en un vial con 5 mL de caldo MRS estéril y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas.

Una vez transcurridas las 18 horas, el cultivo se diluyó 100 veces en agua peptonada al 0.1% estéril y después se tomó el volumen específico para inocular el matraz con la mezcla de agua y maíz al 1% del volumen total; en este caso el volumen de la mezcla era de 150 mL, por lo que se agregaron 1.5 mL del cultivo. El procedimiento ya descrito se observa con mayor detalle en la Figura 6.4.4.



**Figura 6.4.4. Preparación e inoculación del cultivo iniciador para realizar la fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10).**



La fermentación mixta se llevó a cabo de la misma forma como se indicó anteriormente, se realizó cada paso de la reactivación de cada una de las cepas por separado hasta su incubación a 30°C por 18 horas. Después se realizaron diluciones diferentes para cada cepa antes de ser inoculadas en el matraz con el maíz. Como se observa en la Figura 6.4.5; para el caso de *L. lactis* (A1MS3) se realizaron 3 diluciones, mientras que para *P. pentosaceus* (Sol10) solo se llevó a cabo una dilución.

Una vez realizadas las diluciones se tomó el volumen correspondiente para que en conjunto se adicionará el inóculo al 1% del volumen total del matraz con la mezcla de agua y maíz. En este caso se adicionó 1 mL de cada cepa en un matraz que contenía 200 mL de la mezcla de agua y maíz.

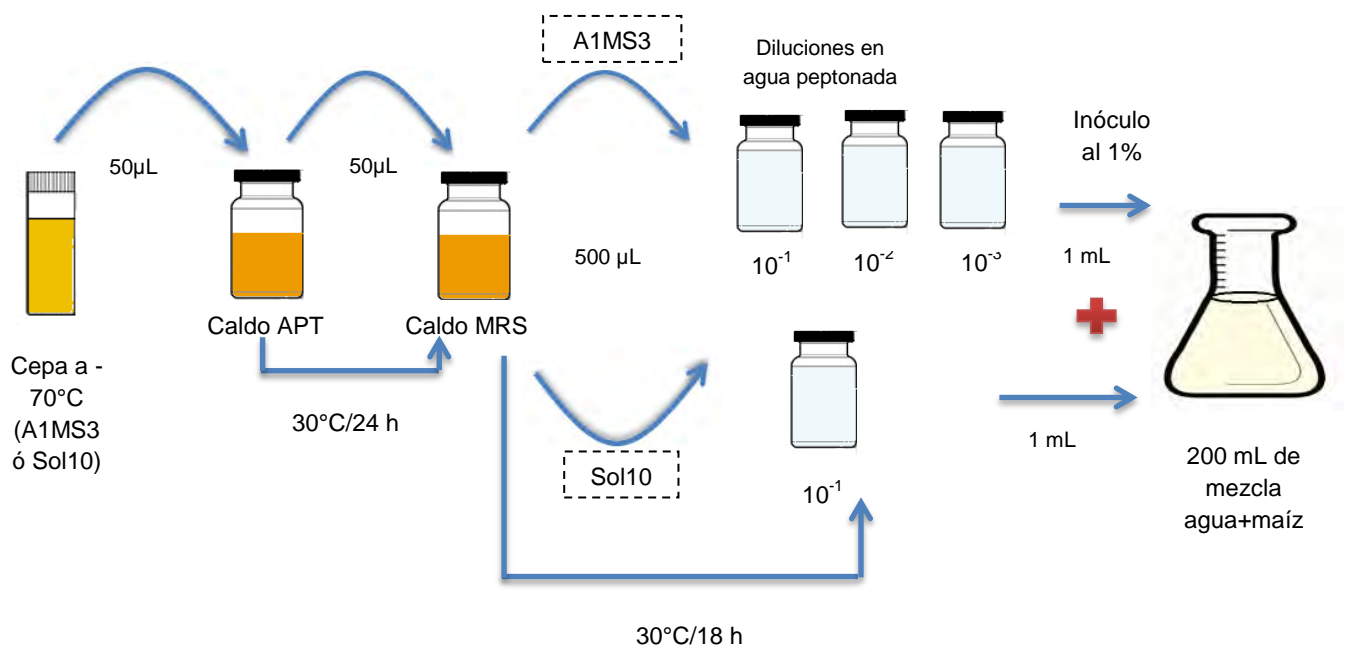


Figura 6.4.5. Preparación e inoculación del cultivo iniciador para realizar la fermentación mixta inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10).



## 6.5 Parámetros a evaluar del atole agrio

### 6.5.1 Determinación de pH

Se tomaron 10 mL de muestra de atole agrio de cada fermentación por triplicado y se agregaron 10 mL de agua destilada. Se realizó la medición empleando un potenciómetro (Oakton pH 700), utilizando previamente los buffers de pH 4, 7 y 10 para su calibración. Las mediciones se realizaron en los tiempos 0, 3, 6, 9 12 y 24 horas de cada fermentación realizada.

### 6.5.2 Determinación de acidez titulable

Se tomaron 10 mL de muestra de atole de cada fermentación por triplicado y se agregaron 10 mL de agua destilada. Se valoraron con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. Las mediciones se realizaron en los tiempos 0, 3, 6, 9 12 y 24 horas de cada fermentación realizada. Para obtener el porcentaje de ácido láctico presente se utilizó como referencia la NMX-F-511-1988.

$$\text{Acidez g/L (ácido láctico)} = \frac{V \times N \times 0.09}{M} \times 100$$

Donde: V = mL de NaOH 0.1 N gastados en la titulación, N = Normalidad de la solución de NaOH, M = Volumen de la muestra tomada y 0.09 = Miliequivalente del ácido láctico.

### 6.5.3 Cuantificación de grupos microbianos

En condiciones de asepsia se hicieron diluciones seriadas en agua peptonada al 0.1% estéril. Se cuantificaron bacterias lácticas (medio MRS Difco™), mesófilos aerobios (agar cuenta en placa Difco™; ACP), enterobacterias (agar bilis rojo violeta con glucosa OXOID; VRBGA), hongos y levaduras (agar papa y dextrosa BD Bioxon; APD). De las diluciones se tomaron 0.1 mL del cultivo, se añadieron a la placa correspondiente, por duplicado y se extendió el inóculo con una varilla de vidrio doblada en L previamente flameada. Las placas se incubaron a 30°C para los medios MRS, APD y ACP, y a 37°C para el medio VRBGA durante 24 horas. Los ensayos para la cuantificación de microorganismos se realizaron en los



tiempos 0, 3, 6, 9 12 y 24 horas, y por triplicado de cada fermentación realizada. Se cuantificaron las colonias de las placas que se encontraron dentro del intervalo de 25 a 250 UFC para bacterias lácticas y mesófilos aerobios. En caso de los hongos y las levaduras el intervalo de sensibilidad es de 10 a 150 y para enterobacterias de 15 a 150 UFC/placa (según la NOM- 092, 111 y 113 respectivamente). A manera de ilustrar el procedimiento anterior, se muestra la Figura 6.5.3.1.

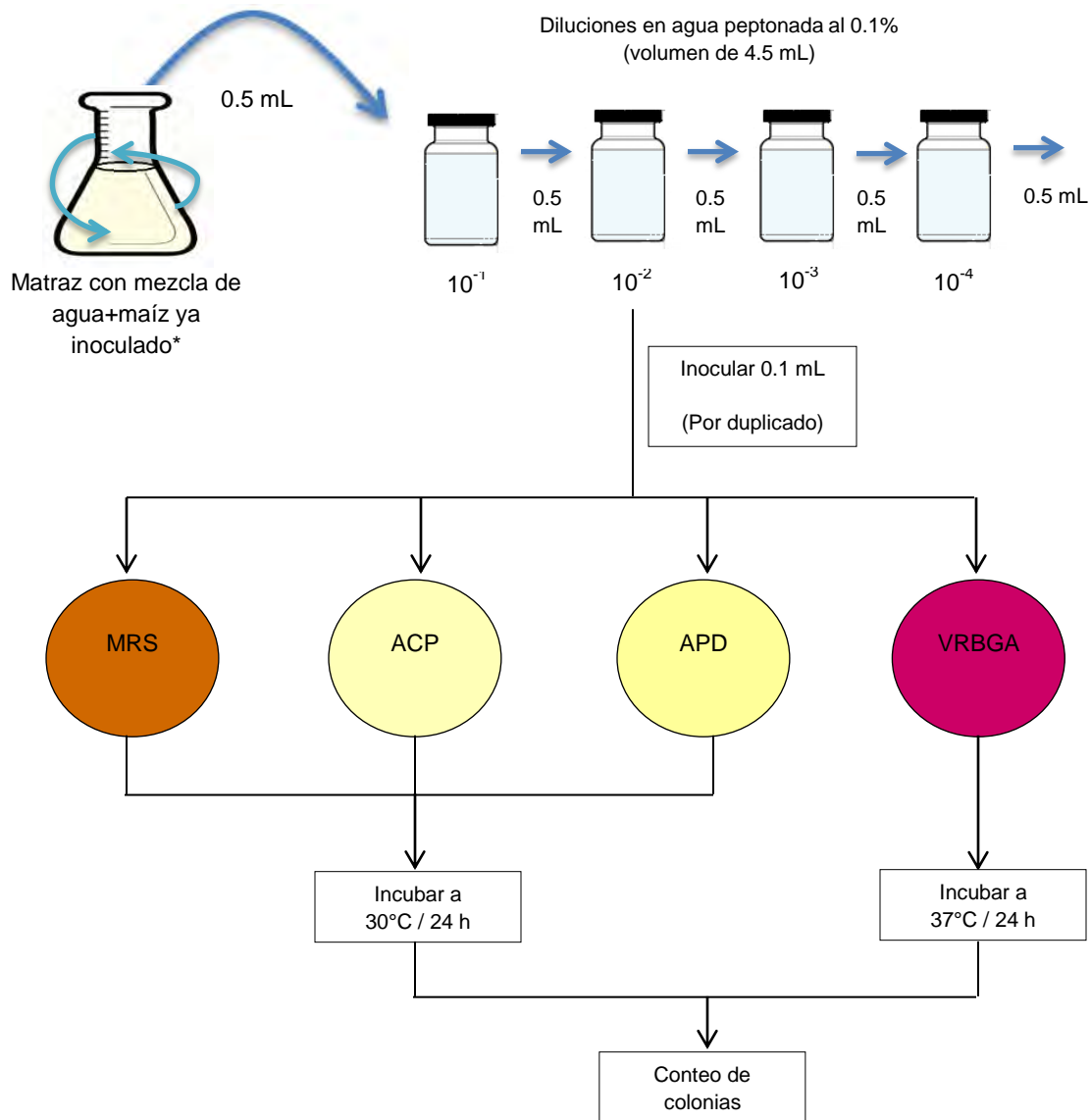


Figura 6.5.3.1. Procedimiento para cuantificación de microorganismos



#### **6.5.4 Cuantificación de carbohidratos totales**

La concentración de azúcares totales se determinó a través del método de Fenol-Sulfúrico; empleando una curva de calibración, para la cual se prepararon soluciones de 0, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/mL. Se utilizó glucosa con una concentración de 1 g/L, como solución estándar.

Para la aplicación del método de Fenol-Sulfúrico se colocó 1 mL de la muestra de atole agrio en un tubo de ensaye (a la cual se le había realizado una dilución de 1/1000 anteriormente), a éste se adicionaron 0.5 mL de fenol al 5% y se mezcló cada tubo. Posteriormente se añadieron 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y nuevamente se homogenizó cada tubo. La mezcla se dejó enfriar en un baño de hielo durante 15 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) a una longitud de onda de 480 nm, frente a un blanco de agua destilada preparado de la misma forma. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios (Southgate, 1991).

#### **6.5.5 Cuantificación de carbohidratos reductores**

La concentración de azúcares reductores se determinó a través del método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Se empleó una curva de calibración, para la cual se prepararon soluciones de 0-0.5 mg/mL; utilizando glucosa con una concentración de 1 g/L, como solución estándar.

Para la aplicación del método del ácido dinitrosalicílico (DNS) se colocó 1 mL de la muestra de atole agrio en un tubo de ensaye (a la cual se le había realizado una dilución de 1/100 anteriormente), se adicionaron 1.5 mL del reactivo de DNS, se homogenizó cada tubo y se calentaron por 5 min en un baño de agua hirviente. Se dejaron enfriar en un baño de hielo por 15 minutos, se agregaron 5 mL de agua destilada y se homogenizó nuevamente cada tubo. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) a una longitud de onda de 540 nm frente a un blanco de agua destilada tratado de la misma forma que la muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios (Carrillo, 2002).





La cuantificación tanto para carbohidratos totales como reductores se realizó interpolando los valores de absorbancia obtenidos de la muestra con la curva de calibración de glucosa preparada para cada reacción, y posteriormente graficando la absorbancia en función de la concentración. Además para el cálculo se consideró la dilución empleada para cada método. Las mediciones de carbohidratos se realizaron en los tiempos 0, 3, 6, 9 12 y 24 horas de cada fermentación realizada.

### **6.5.6 Prueba sensorial**

De las muestras de atole agrio analizadas en el laboratorio, se evaluaron sensorialmente aquellas obtenidas en los tiempos 6, 9 12 y 24 horas de cada fermentación realizada. Para su evaluación sensorial en el laboratorio se pasó la solución de atole agrio por un colador para retirar la cascarilla del maíz. Inmediatamente después se colocaron las muestras en una olla y se calentaron hasta obtener una consistencia espesa, similar a la de un atole tradicional. El tiempo de calentamiento varió entre 3 hasta 5 minutos. Posteriormente se evaluaron las muestras de atole entre los integrantes del laboratorio, para la selección del tiempo en la que la muestra fuera más agradable o ya sea en cuál de los tiempos la muestra presentaba mejores características sensoriales; sabor, olor, y textura principalmente.

El atole agrio obtenido a través de la fermentación natural mostró mejores características a las 12 horas de fermentación; mientras que las muestras de atole inoculado con *L. lactis* (A1MS3), *P. pentosaceus* (Sol10), y la fermentación mixta mostraron mejores características sensoriales a las 10.5 horas de fermentación. Además se evaluó una muestra más, que fue la mezcla por separado de las fermentaciones inoculadas con *L. lactis* y *P. pentosaceus* a las 10.5 horas de fermentación; esta mezcla se realizó antes de calentar el atole para su consumo o evaluación sensorial.



## 6.6 Perfil sensorial de las muestras de atole agrio

Una vez elegidas las muestras se realizó en el laboratorio de la Dra. Patricia Severiano; de la Facultad de Química, una evaluación de atributos de cada muestra de atole con jueces entrenados en la metodología de Perfil Flash (De la Garza, 2016). Se prepararon 200 mL de cada muestra para la generación de atributos de cada una, y se le brindó el mismo tratamiento para la eliminación de la cascarilla y calentamiento que se le dio en el laboratorio a cada muestra antes de su evaluación con los jueces.

El análisis de Perfil Flash se realizó con 14 jueces que generaron los atributos y seleccionaron los que definen a las muestras de atole agrio. El rango de edad de los jueces fue de 21-25 años, 35.7 % hombres y 64.2 % mujeres, todos estudiantes de la Facultad de Química, UNAM. Los datos se analizaron utilizando la metodología de análisis Generalizado de Procrustes (De la Garza, 2016).

Como se menciona en el anexo, el Perfil Flash involucra dos sesiones principales y una sesión intermedia. En la primera sesión se presentaron las muestras a evaluar a cada uno de los jueces. Las 5 muestras de atole agrio a evaluar fueron por fermentación natural a las 12 horas de fermentación, fermentación inoculada con *L. lactis* (A1MS3), fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10), fermentación mixta y la mezcla por separado de las fermentaciones inoculadas con *L. lactis* y *P. pentosaceus*; donde estas cuatro últimas se tomaron para su análisis a las 10.5 horas de fermentación. Las 5 muestras ya descritas fueron evaluadas por los jueces para generar los atributos que los describieran.

En la sesión intermedia; una vez que se generaron los atributos de cada juez, se creó una lista grupal con los atributos que describen a cada muestra evaluada. Dicha lista se proporcionó a los jueces para que se familiarizaran con el vocabulario seleccionado.



Finalmente en la segunda sesión; se preparó un litro de cada muestra para que los panelistas las clasificaran para cada atributo seleccionado (Figura 6.6.1). Una vez generados los datos se trataron con un software especializado en este tipo de pruebas y como resultado se obtuvieron las gráficas que se presentan en el apartado de resultados.

Con base en la información sobre el Mapa Interno de preferencia (IPM), en las gráficas se observaron puntos donde se localizaba cada muestra evaluada y los vectores representan los atributos que las definen.



**Figura 6.6.1. Evaluación sensorial de las muestras de atole agrío por los jueces**



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Experimentos preliminares

#### 7.1.1 Reactivación de las cepas.

Una vez realizada la reactivación de las cepas, para comprobar su pureza se sembraron en placas con medio MRS. A las 24 horas de crecimiento de manera general se observaron colonias pequeñas, redondas, de color blanco; su tamaño es atribuible a los bajos rendimientos de crecimiento; consecuencia de su metabolismo exclusivamente fermentativo (Stainer et al., 1992). Una vez identificado solo un tipo de colonias en las placas se realizó una Tinción de Gram para cada una de las cepas sembradas y se observó su morfología microscópica. Los resultados se encuentran en el Cuadro 7.1.1.1.

#### Cuadro 7.1.1.1. Descripción microscópica de las cepas

Clave de la cepa	Especie	Características microscópicas
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos Gram-positivos, en pares, en cadenas cortas y algunos sin agrupación definida.
10	<i>Lactococcus lactis</i>	Cocos Gram-positivos, en pares, en racimo y algunos sin agrupación definida.
11	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Bacilos cortos Gram-positivos, en pares, en cadenas cortas y cadenas largas.
A1MM10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos cortos Gram-positivos, en pares aislados y en cadenas cortas.
Sol10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Cocos Gram-positivos, sin agrupación definida, algunos en pares.
A1MS3	<i>Lactococcus lactis</i>	Cocos Gram-positivos, en pares, en triadas y en cadenas largas.



Como se observa en el Cuadro 7.1.1.1 todas las cepas de las bacterias aisladas resultaron ser Gram-positivas y su morfología característica concuerda con el género correspondiente según se reporta en la literatura. El género *Lactococcus* se compone de células esféricas (Jay, Loessner & Golden, 2005) u ovoides en pares o cadenas cortas (Ray & Bhunia, 2010), aunque también suelen presentarse de manera individual (Jay et al., 2005). De las que se observaron, algunas no presentaban agrupación definida o también formaban triadas, además de presentar las características reportadas en la literatura. El género *Lactobacillus* es un grupo heterogéneo de especies Gram-positivas con forma de bacilo con una amplia variedad en cuanto a morfología, varían de bastoncillos muy cortos a muy largos, de delgados a moderadamente gruesos y pueden estar presentes como células simples o en cadenas cortas o largas (Ray & Bhunia, 2010), así se reporta en el Cuadro 7.1.1.1.

Ambas cepas de *L. plantarum* formaron cadenas cortas pero además se encontraron pares y algunos sin agrupación definida. Las bacterias del género *Leuconostoc* son células Gram-positivas esféricas a lenticulares, acomodadas en pares o cadenas (Ray & Bhunia, 2010); mientras que el género *Pediococcus* son células esféricas y forman tétradas, pero pueden presentarse en pares (Jay et al., 2005; Ray & Bhunia, 2010), en este caso la preparación observada no tenía una agrupación definida, sin embargo se observaban algunos pares aislados.



### 7.1.2 Selección de maíz y de las cepas.

En el segundo experimento se realizaron atoles de prueba con dos diferentes lotes de maíz. Debido a que eran experimentos preliminares, solo se realizó una fermentación de prueba y únicamente se midió el pH de los productos en el tiempo cero y a las 12 horas de fermentación, sin la inoculación de ninguna cepa. Como se observa en el Cuadro 7.1.2.1, con ambos tipos de maíz el pH disminuyó de un valor aproximado de 6.4 a 3.9 - 4.0. Esto es debido al desarrollo de las bacterias lácticas presentes en el sustrato. Una vez medido el pH se prepararon los atoles como se indicó anteriormente y se evaluó su aroma, sabor y consistencia. Dicha descripción se presenta en la Cuadro 7.1.2.2, donde de manera general se puede observar que tanto en el maíz 1 como en el 2 en la fermentación sólida se obtuvieron productos con consistencia espesa con un aroma ligeramente a fermentado, ácido, sabor insípido y ligeramente ácido, mientras que en el caso de la fermentación líquida para ambos maíces resultó diferente la consistencia debido que requirió un tiempo de cocción bajo, aproximadamente de 3-4 minutos. El aroma ácido es más intenso y se percibe un sabor más ácido en comparación con los productos obtenidos por fermentación sólida; sin embargo entre el maíz 1 y el maíz 2, el número 2 resultó más ácido que el atole de la fermentación líquida del maíz 1.

Los atoles elaborados con cada uno de los dos maíces mostraron capacidad fermentativa, ya que en ambos se observó un descenso de pH después de 12 horas de fermentación. Según las características obtenidas de los productos desarrollados se decidió trabajar con el maíz 1, ya que éste presentó un sabor menos ácido, comparando los dos lotes obtenidos después de la fermentación líquida de los dos diferentes maíces, ya que para realizar la fermentación inoculada solo se llevará a cabo la fermentación líquida.



**Cuadro 7.1.2.1. Valor de pH del atole agrio obtenido por fermentación natural con los diferentes lotes de maíz.**

Tipo de fermentación	Maíz 1	Maíz 2
Antes de la fermentación		
Sólida	6.42	6.42
Líquida	6.43	6.56
Después de la fermentación		
Sólida	4.24	4.09
Líquida	3.98	3.90

**Cuadro 7.1.2.2. Descripción informal de las características de los atoles de prueba obtenidos por fermentación natural.**

Tipo de fermentación	Maíz 1	Maíz 2
<b>Fermentación sólida</b>	El atole tiene una consistencia espesa y homogénea en comparación con la fermentación líquida. Sabor insípido, a fermentado y ligeramente ácido.	El atole tiene una consistencia ligeramente espesa y un aroma ligero a masa fermentada. Sabor insípido, ácido; y éste no se percibe instantáneamente.
<b>Fermentación líquida</b>	El atole tiene una consistencia muy espesa, con grumos y tiene un aroma muy ácido. Sabor insípido, a fermentado y más ácido con respecto al de la fermentación sólida.	El atole tiene una consistencia líquida, heterogénea y tiene un aroma a fermentado y muy ácido. Sabor insípido, el sabor es inmediato y mucho más ácido que el atole de la fermentación líquida del maíz 1.



## 7.2 Fermentaciones del atole agrio

### 7.2.1 Comparación de los valores de acidez titulable (% ácido láctico) de las fermentaciones.

Cuadro 7.2.1.1. Valores de acidez titulable (% ácido láctico) de la fermentación natural, fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3), fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) y fermentación mixta; inoculada con ambas cepas, del atole agrio.

Tiempo (horas)	0	3	6	9	10.5	12	24
F. natural	0.078±0.005	0.084±0.019	0.078±0.010	0.093±0.023	----	0.201±0.014	0.453±0.050
F. inoculada (A1MS3)	0.078±0.005	0.087±0.014	0.216±0.009	0.285±0.027	0.348±0.052	0.345±0.027	0.372±0.036
F. inoculada (Sol10)	0.081±0.009	0.093±0.005	0.135±0.009	0.366±0.014	0.360±0.009	0.486±0.024	0.603±0.032
F. mixta	0.069±0.005	0.081±0.009	0.204±0.019	0.354±0.061	0.324±0.024	0.381±0.034	0.435±0.036

Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas  $\pm$  desviación estándar. ----no se realizó la prueba.

Se realizaron cuatro ensayos de fermentación; una de tipo natural (sin inoculación con ninguna cepa), dos inoculadas con una cepa en cultivo puro y una fermentación inoculada con ambas cepas, llamada fermentación mixta. Las dos cepas que se emplearon fueron *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10). Uno de los parámetros a medir fue el porcentaje de acidez titulable; medida como la concentración de ácido láctico que se forma con el paso de la fermentación por medio del metabolismo homofermentativo de las bacterias ácido lácticas inoculadas. En todos los casos el valor inicial de acidez titulable fue de 0.08% aproximadamente; a las 24 horas en la fermentación natural la acidez titulable fue de 0.453%, como se observa en el Cuadro 7.2.1.1.





En el medio inoculado con *Lactococcus lactis* la concentración final de ácido láctico fue de 0.372%, mientras que en el caso de la fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus*; fue de 0.603%. En la fermentación mixta la concentración de ácido láctico fue de 0.435% al término del proceso de fermentación (Cuadro 7.2.1.1).

Con la cepa de *Pediococcus pentosaceus* se obtiene la mayor concentración de ácido láctico (0.603%). Esto indica que el microorganismo podría ser más eficiente para transportar y fermentar los carbohidratos, además se podrían estar produciendo sustancias antimicrobianas inhibiendo a la microbiota acompañante, mientras que con la cepa de *Lactococcus lactis* se obtiene una concentración más baja con respecto a la fermentación natural y la mixta. Por otra parte, en el cultivo mixto de ambas cepas probablemente existe algún tipo de interacción negativa que genere competencia entre ellas en cuanto al uso de carbohidratos y por consiguiente la producción de ácido láctico es menor o se podrían estar produciendo sustancias antimicrobianas.

En las cuatro muestras de fermentación la concentración de ácido láctico va incrementando con el transcurso del proceso fermentativo, desde las 3 hasta las 24 horas. En los cuatro procesos se observó una diauxia. La concentración de ácido láctico disminuyó en ciertos puntos de la fermentación; a las 6 horas para la fermentación natural, 12 horas para la fermentación con *L. lactis*, y a las 10.5 horas para la inoculada con *P. pentosaceus* y la fermentación mixta. Sin embargo, inmediatamente al siguiente tiempo de medición la concentración aumenta nuevamente, hasta llegar a una concentración final mayor con respecto a la que se tenía al inicio de la producción del atole. Esto sugiere que utilizan dos sustratos diferentes y que cuando uno se acaba utilizan el segundo.



## 7.2.2 Comparación de los valores de pH de las fermentaciones.

**Cuadro 7.2.2.1. Valores de pH de la fermentación natural, fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3), fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) y fermentación mixta del atole agrio.**

Tiempo (horas)	0	3	6	9	10.5	12	24
F. natural	6.37±0.00	6.16±0.01	6.11±0.03	5.90±0.03	----	3.90±0.15	3.44±0.01
F. inoculada (A1MS3)	6.38±0.01	6.03±0.02	3.66±0.04	3.45±0.04	3.64±0.05	3.54±0.04	3.42±0.05
F. inoculada (Sol10)	6.29±0.01	6.07±0.03	5.46±0.09	3.54±0.02	3.61±0.03	3.42±0.01	3.32±0.03
F. mixta	6.19±0.03	5.97±0.02	3.90±0.05	3.35±0.02	3.48±0.03	3.40±0.01	3.25±0.01

Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas  $\pm$  desviación estándar. ---- no se realizó la prueba.

El pH inicial varió entre 6.2 y 6.4 y luego disminuyó hasta 3.4 en las fermentaciones natural e inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3), hasta 3.3 con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) y 3.2 con la fermentación mixta (Cuadro 7.2.2.1). En las tres fermentaciones inoculadas, tanto con los cultivos puros como en el mixto, a las 10.5 horas el pH subió ligeramente con respecto al valor que se obtuvo a las 9 horas. Luego el pH de nuevo disminuyó a las 12 horas y continuó así hasta el final de la fermentación. Este aumento de pH está relacionado con el declive en la producción de ácido por las bacterias lácticas en este tiempo de la fermentación, resultados que ya se habían discutido en el apartado de acidez titulable. Este comportamiento también puede ser debido a la presencia de péptidos o algún compuesto con grupo amino que se liberaron durante la fermentación.



Como se observa en el Cuadro 7.2.2.1, el descenso de pH en las cuatro muestras mostró un comportamiento similar, ya que fue decreciendo conforme transcurría el tiempo de fermentación. Sin embargo; como se esperaba, en las fermentaciones inoculadas el pH disminuyó más rápidamente desde que se inocularon los cultivos al inicio de la producción del atole agrio (tiempo cero) hasta el final; debido a la formación de ácido láctico principalmente por las bacterias lácticas empleadas.

No obstante el valor final fue muy cercano entre sí, tanto en la fermentación natural como en las inoculadas. Sin embargo, cabe mencionar que el pH que se obtuvo en estudios anteriores del atole agrio (fermentación natural) mostraban valores más altos, con un valor de pH de hasta 4 a las 6 horas de fermentación (Valderrama, 2012) y en otro caso donde realizaban la medición hasta las 12 horas con un valor de pH de 4.3 (Esquivel, 2012). La velocidad de disminución del pH en el atole es importante; ya que mientras el valor de pH sea alto, pueden crecer bacterias patógenas; lo que no es deseable en el producto y por lo tanto su ingesta podría causar algún riesgo en los consumidores. Por lo tanto es posible que el producto obtenido en este proyecto presente menor riesgo para su consumo.



### 7.2.3 Crecimiento de microorganismos en las fermentaciones

#### ∞ Concentración de microorganismos durante la fermentación natural.

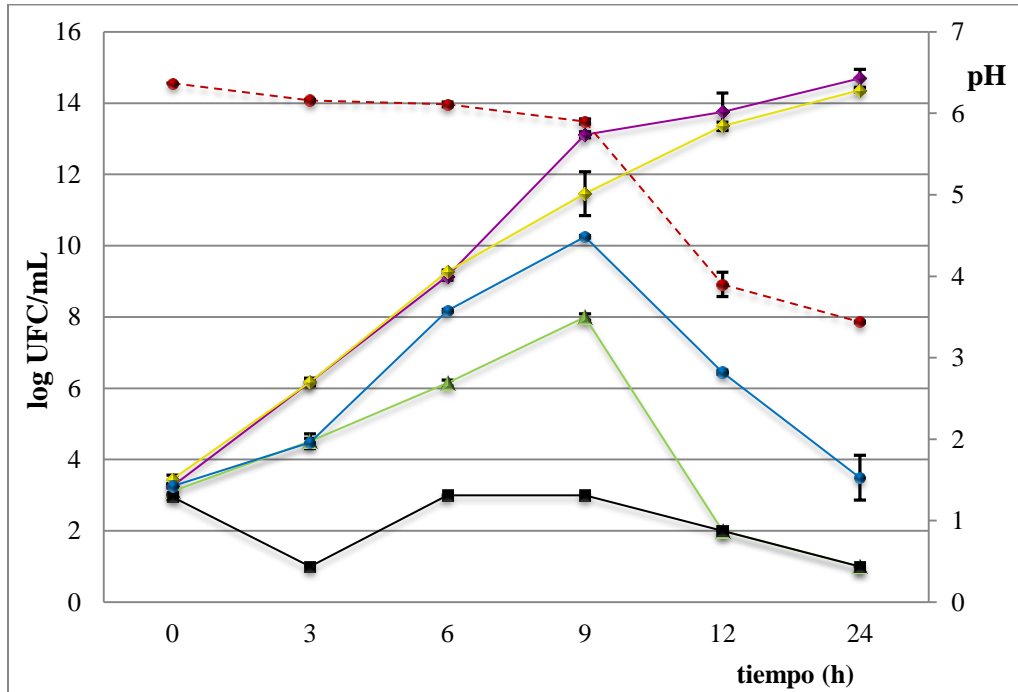


Figura 7.2.3.1. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio. Concentración de bacterias lácticas (línea morada), mesófilos aerobios (línea amarilla), enterobacterias (línea azul), levaduras (línea verde), hongos (línea negra) y valores de pH (línea punteada en rojo).

Se cuantificaron cinco grupos microbianos (bacterias lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias, hongos y levaduras), para cada una de las fermentaciones realizadas. De acuerdo con los resultados obtenidos en la fermentación natural, la concentración de microorganismos al inicio no fue alta como en otros estudios (Esquivel, 2012; Valderrama, 2012), ya que el proceso de elaboración del atole fue modificado; empleando material y agua potable estériles. Se llevó a cabo su preparación en condiciones de asepsia lo que ayudó a reducir la carga microbiana proveniente de fuentes externas y sólo se contabilizó la cuenta perteneciente al grano de maíz usado como sustrato, además de que éste es un tipo diferente de maíz.



Como se observa en la Figura 7.2.3.1 la concentración inicial de cada grupo fue de aproximadamente 3 logUFC/mL, comparada con la de estudios mencionados anteriormente; que fueron desde 4 hasta 8 logUFC/mL en los diferentes grupos microbianos evaluados. Las bacterias lácticas se desarrollaron en la fermentación hasta alcanzar cuentas muy altas (14.7 logUFC/mL). Los mesófilos aerobios incluyen tanto a las bacterias lácticas como a otras bacterias y a las levaduras, como las cuentas de estos tres grupos fueron similares al inicio, y al final las cuentas de mesófilos también fueron altas; alrededor de 14 logUFC/mL debido a que éstas incluyen a las bacterias lácticas; cuya cuenta es similar, es posible que la cuenta de mesófilos aerobios no lácticos haya sido muy baja.

Las enterobacterias se desarrollaron hasta una concentración de aproximadamente 10 logUFC/mL después de 9 horas de fermentación; cuando el pH en este punto ya había alcanzado un valor de 5.90. Después descendieron hasta llegar a una concentración de 3.5 logUFC/mL, cuando el pH bajó hasta 3.44. Las levaduras crecieron igual que las enterobacterias hasta las 9 horas de fermentación con una cuenta de 8 logUFC/mL y después sus cuentas disminuyeron; pero los hongos no se desarrollaron de esa manera, éstos solo estuvieron presentes en el tiempo cero, disminuyeron a las 3 horas de fermentación y después ya no se encontró presencia de colonias en los siguientes tiempos evaluados.



### Concentración de microorganismos durante la fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3).

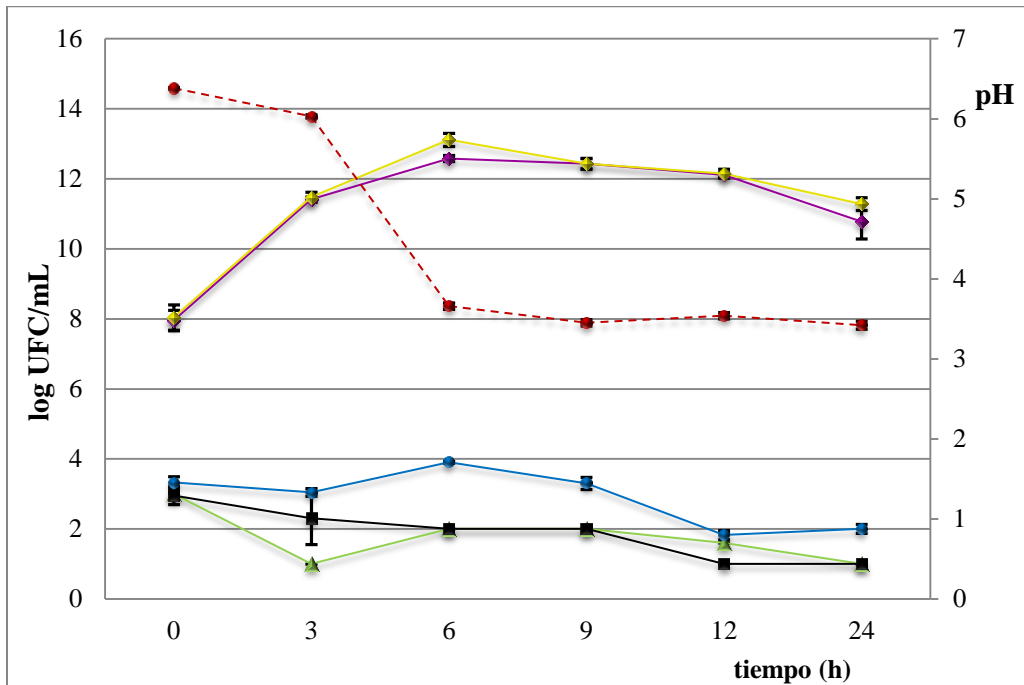


Figura 7.2.3.2. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) del atole agrio. Concentración de bacterias lácticas (línea morada), mesófilos aerobios (línea amarilla), enterobacterias (línea azul), levaduras (línea verde), hongos (línea negra) y valores de pH (línea punteada en rojo).

Cuando se inoculó el sustrato con *L. lactis* (A1MS3), las cuentas iniciales de bacterias lácticas; como se esperaba, fueron mayores que en la fermentación natural (7.9 logUFC/mL) y se multiplicaron hasta alcanzar cuentas de 12 logUFC/mL, pero a las 6 horas de fermentación empezó la fase de muerte, hasta llegar a una concentración final de 10.8 logUFC/mL. El comportamiento de los mesófilos aerobios fue similar al de las bacterias lácticas empezando con una cuenta de 8 logUFC/mL y bajando a las 6 horas hasta llegar a una concentración de 11.3 logUFC/mL como valor estimado. (Estos datos se observan en la Figura 7.2.3.2 y en el Cuadro 10.2.2 en el anexo).



Las enterobacterias iniciaron con una cuenta de 3 logUFC/mL y se multiplicaron hasta 3.9 logUFC/mL, posteriormente a las 6 horas con un pH de 3.66 comenzaron a morir, por lo que la cuenta bajó y continuó con ese descenso hasta las 12 horas de fermentación llegando a una concentración de 1.8 logUFC/mL, pero aumentó ligeramente a las 24 horas. Las levaduras mostraron un comportamiento variable, ya que iniciaron con una cuenta de 3 logUFC/mL, después no se encontraron colonias, nuevamente aparecieron a las 12 horas y al término la cuenta fue nula, mientras que los hongos sólo se desarrollaron al inicio y después no se encontraron.

### Concentración de microorganismos durante la fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10).

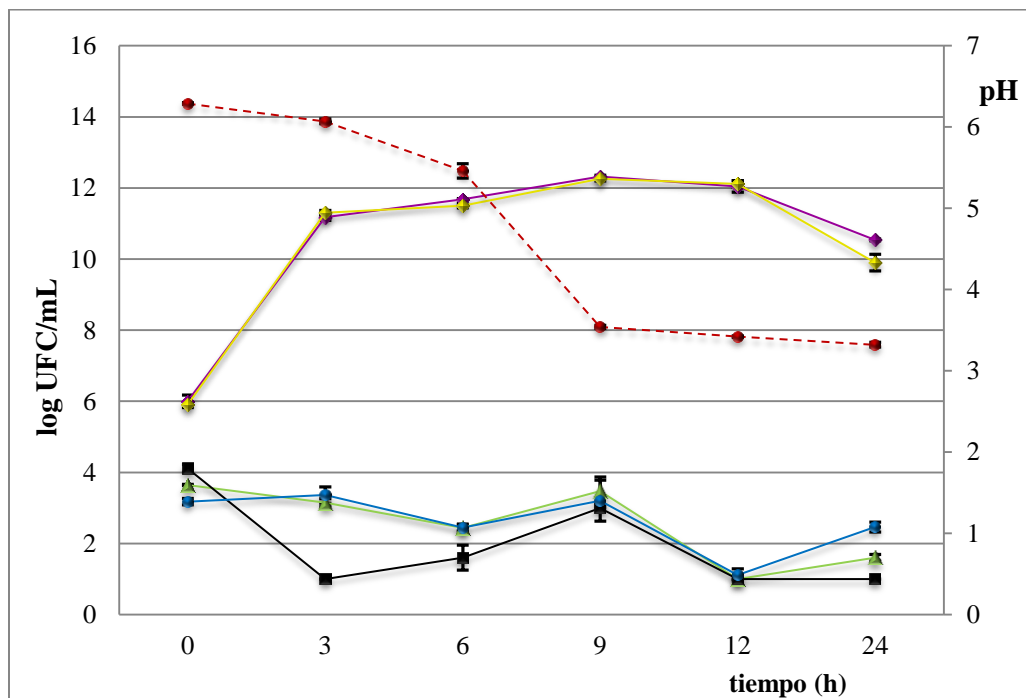


Figura 7.2.3.3. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) del atole agrio. Concentración de bacterias lácticas (línea morada), mesófilos aerobios (línea amarilla), enterobacterias (línea azul), levaduras (línea verde), hongos (línea negra) y valores de pH (línea punteada en rojo).



En la fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10) la concentración de bacterias lácticas como la de mesófilos fue más baja en comparación de la obtenida con *L. lactis* (A1MS3), donde la cuenta inicial para ambos grupos fue de 6 logUFC/mL. Las bacterias lácticas se multiplicaron a lo largo del proceso hasta llegar a una concentración de 12 logUFC/mL y la cuenta comenzó a disminuir a las 9 horas y al final la concentración fue de 10.5 logUFC/mL. El comportamiento de los mesófilos aerobios nuevamente fue similar al de las bacterias lácticas, obteniéndose al final una concentración de 9.9 logUFC/mL.

Por otro lado la concentración de enterobacterias también se encontró en el orden de 3 logUFC/mL manteniéndose prácticamente constante en ese margen hasta llegar a las 9 horas, cuando el pH se encontraba en 3.54 y comenzó así la fase de muerte, llegando hasta una concentración de 1.1 logUFC/mL a las 12 horas, sin embargo como en el caso de *Lactococcus*, a las 24 horas incrementó ligeramente la concentración. En cuanto a las levaduras mostraron un desarrollo constante. A las 9 horas disminuyeron, pero al final aún se encontraron algunas colonias. Los hongos tuvieron un comportamiento variable se lograron desarrollar hasta las 9 horas de fermentación y después murieron. (La descripción anterior se puede observar en la Figura 7.2.3.3 y en el Cuadro 10.2.3 en el anexo).





∞ **Concentración de microorganismos durante la fermentación mixta inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10).**

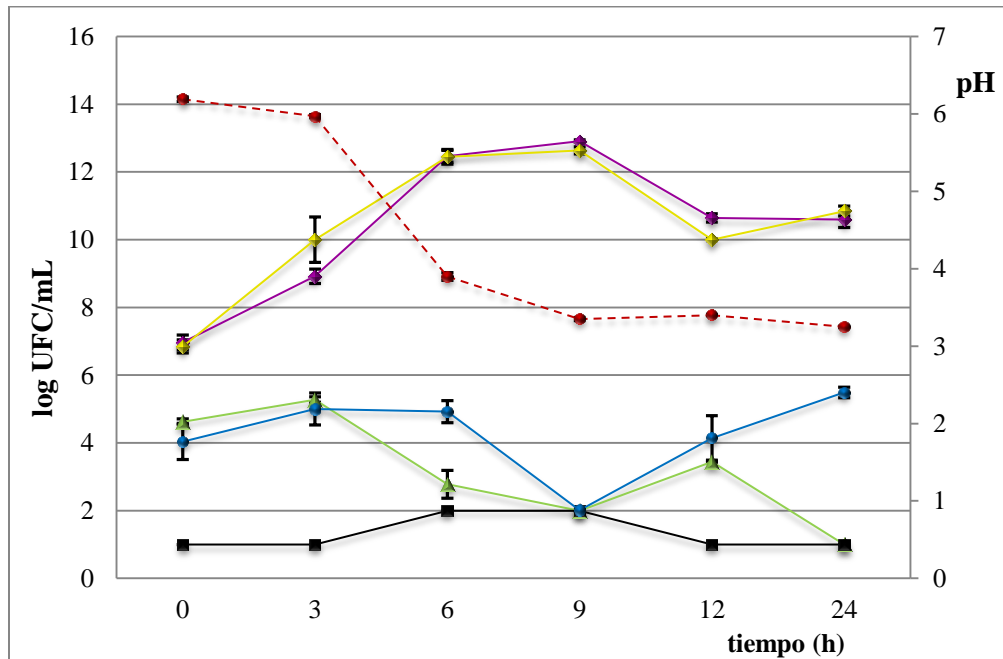


Figura 7.2.3.4. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) del atole agrio. Concentración de bacterias lácticas (línea morada), mesófilos aerobios (línea amarilla), enterobacterias (línea azul), levaduras (línea verde), hongos (línea negra) y valores de pH (línea punteada en rojo).

Por último se llevó a cabo la fermentación mixta, en donde se inocularon ambas cepas y se realizó el conteo de los mismos grupos microbianos. En esta fermentación el comportamiento de las bacterias lácticas como el de mesófilos fue muy similar al obtenido con *P. pentosaceus* (Sol10). La concentración inicial de ambos grupos fue de 7 logUFC/mL y se desarrollaron hasta alcanzar una cuenta de 13 logUFC/mL. A las 9 horas comenzó la fase muerte y las concentraciones disminuyeron hasta el final, así las concentraciones obtenidas a las 24 horas fueron de 10.6 y 10.8 logUFC/mL para las bacterias lácticas y mesófilos aerobios, respectivamente. Resultados que se encuentran en la Figura 7.2.3.4 y en el Cuadro 10.2.4 en el anexo.



La concentración inicial de enterobacterias fue mayor con respecto a las demás fermentaciones (4 logUFC/mL). Se desarrollaron hasta alcanzar cuentas de 5 logUFC/mL a las 3 horas, a partir de ese momento la concentración disminuyó, hasta llegar a un punto mínimo a las 9 horas de fermentación, con un valor de 2 logUFC/mL cuando el pH era de 3.35; sin embargo la cuenta aumentó nuevamente a las 12 y 24 horas. Las levaduras también se desarrollaron hasta obtener cuentas de 5 logUFC/mL a las 3 horas, a partir de las 6 horas la cuenta descendió, aumentó a las 12 y murieron al término del proceso. Los hongos no se desarrollaron en esta muestra de atole agrio.

Una vez analizados los cuatro tipos de fermentación; para el término de la fermentación natural la concentración final de las bacterias lácticas, mesófilos aerobios y enterobacterias no disminuyó con respecto a la inicial. Para el caso de los mesófilos aerobios y bacterias lácticas la cuenta al término de la fermentación se elevó y esto debido a que las cuentas altas de mesófilos incluyen a las bacterias lácticas, las cuales se encuentran en alta concentración en el atole agrio ya que éstas resisten las condiciones ácidas del medio que se fueron generando.

Tanto en la fermentación con *L. lactis* (A1MS3) como con *P. pentosaceus* (Sol10) al inicio las cuentas de bacterias lácticas y mesófilos aerobios fueron altas debido a la inoculación realizada, sin embargo a las 24 horas de fermentación la cuenta de mesófilos y bacterias lácticas aún permaneció alta, ya que las bacterias ácido lácticas se incluyen en el grupo de las bacterias mesófilas, y presentan la característica de desarrollarse en condiciones ácidas, pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, pero la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir en medios con alta actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramírez et al., 2011).

En cuanto a la concentración de enterobacterias en ambas fermentaciones se observó un descenso en la cuenta final con respecto a la del tiempo a la inicial, y entre las 9 y las 12 horas de fermentación se encuentra una concentración mínima de estas bacterias, ya que la producción de ácidos orgánicos reduce el pH



haciendo difícil la supervivencia de algunos organismos que están presentes en los cereales (Blandino et al., 2003). Además de que el pH cae por debajo del límite al que pueden crecer normalmente las bacterias, o por debajo del pH donde se lleva a cabo su crecimiento óptimo (Jay et al., 2005). Aunque debe mencionarse que la concentración de enterobacterias en todo el proceso de la fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10) fue menor que la concentración obtenida en las demás muestras.

En ningún caso se logró la eliminación completa de las enterobacterias, lo cual coincide con reportes de la fermentación del pozol, en el cual se encontraron cepas de *E. coli* resistentes al pH bajo (Sainz et al., 2001). Esto podría explicar este comportamiento y obliga a revisar el proceso para reducir la cuenta inicial de enterobacterias. Así como en los estudios de atole agrio de Villahermosa realizados anteriormente por Valderrama y Esquivel, donde también se encontró presencia de enterobacterias y coliformes desde el inicio hasta el término de la fermentación. En el caso de la fermentación llevada a cabo por Valderrama (2012) los grupos microbianos evaluados tuvieron un crecimiento masivo, para este caso en particular se evaluaron las bacterias coliformes donde la cuenta siempre fue mayor a 4 logUFC/mL. En cuanto a la fermentación realizada por Esquivel (2012) se evaluaron las enterobacterias, las cuales presentaron cuentas de 8 logUFC/mL al inicio de la fermentación y después de 5 horas comenzó a bajar la población hasta llegar a 4 logUFC/mL a las 12 horas cuando finalizó el proceso. En ambos casos estos grupos microbianos no fueron inhibidos totalmente después del descenso del pH, aunque es importante mencionar que las cuentas bajaron al llevar a cocción el atole agrio para su consumo, probablemente es un paso que faltó analizar en este proyecto.



Por otro lado en la fermentación con *L. lactis* (A1MS3) hay un desarrollo menor de levaduras que en la fermentación con *P. pentosaceus* (Sol10); mientras que el desarrollo de los hongos en ambas fue siempre variable aunque en las dos fermentaciones después de las 6 horas este grupo ya no estaba presente. Esto indica que las interacciones entre la microbiota natural con cada una de las bacterias inoculadas es diferente. Mientras *L. lactis* (A1MS3) no permite un buen desarrollo de las levaduras e inhibe primero a los hongos (a las 3 horas), *P. pentosaceus* (Sol10) permite una mejor multiplicación de las levaduras y elimina a los hongos a las 6 horas de fermentación.

En la fermentación mixta, la concentración final de bacterias lácticas como de mesófilos aerobios; como en los casos anteriores fue mayor a la inicial, pero fue menor con respecto a la concentración máxima alcanzada en el proceso. En este tipo de fermentación no se desarrollaron los hongos y el crecimiento de levaduras fue variable pero disminuyó al término del proceso. Sin embargo la concentración de enterobacterias al final resultó ser mayor que la cuenta inicial, probablemente después de las 9 horas de fermentación se multiplicaron aquellas bacterias que fueron capaces de tolerar el pH ácido del medio, que se desarrollaron por las condiciones generadas, además de que la interacción con ambas cepas lácticas probablemente no ayuda a su mayor reducción en el atole.



#### 7.2.4 Concentración de carbohidratos durante las fermentaciones

Como último parámetro se determinó la concentración de carbohidratos totales y reductores durante la fermentación natural y las fermentaciones inoculadas del atole agrio. Para la obtención de estos resultados se realizaron dos curvas patrón para cada método que se encuentran en las Figuras 10.1.1, 10.1.2 y Figura 10.1.3, para el método de Fenol-Sulfúrico (C. totales) y el método de DNS (C. reductores) respectivamente, situadas en el anexo.

Durante la fermentación natural; en la Figura 7.2.4.1, se observa que la concentración de carbohidratos totales fue decreciendo durante la fermentación, ya que la concentración fue disminuyendo hasta las 6 horas, incrementó nuevamente a las 9 y 12 horas, y volvió a disminuir a las 24, siendo esta última menor a la concentración inicial. Por otro lado la concentración de carbohidratos reductores disminuyó durante la fermentación, de igual forma que con los carbohidratos totales la concentración final resultó ser menor a la inicial; lo que indica que fueron producidos y utilizados por los microorganismos.

En el medio inoculado; tanto con *Lactococcus lactis* (A1MS3) como con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), (Figura 7.2.4.2 y 7.2.4.3, respectivamente) la concentración de carbohidratos totales y reductores disminuyó y aumentó a lo largo de la fermentación, y al término del proceso disminuyeron con respecto a la concentración inicial. En el caso de la fermentación con *L. lactis*, la concentración de carbohidratos totales disminuyó hasta un punto máximo de concentración a las 6 horas. En cuanto a los carbohidratos reductores se mantuvieron en una concentración prácticamente constante, pero al final se encontró una concentración menor que la inicial.



Para el caso de la fermentación con *P. pentosaceus* (Sol10), la concentración de carbohidratos totales aumentó ligeramente a las 3 horas y comenzó a disminuir gradualmente en las siguientes horas. Al igual que con *Lactococcus lactis* (A1MS3) los carbohidratos reductores se mantuvieron en una concentración prácticamente constante, y al final se obtuvo una concentración menor que la inicial. En la fermentación mixta a diferencia de las anteriores (Figura 7.2.4.4), la concentración tanto de carbohidratos totales como reductores permaneció en un intervalo constante. Sin embargo la concentración de carbohidratos totales tuvo mayor tendencia a disminuir; siendo la concentración final menor que la inicial, mientras que los reductores tendieron a aumentar más que en los otros casos y la concentración final fue mayor a la inicial.

En los tres tipos de atole inoculados, a las 24 horas de fermentación se observó un ligero aumento de carbohidratos totales; esto sucedió probablemente porque en este tiempo las bacterias lácticas principalmente ya se encontraban en la fase de muerte, por lo que no consumían el sustrato y la concentración de estos carbohidratos en el medio aumentó. Otra posibilidad es que se estén solubilizando algunos carbohidratos complejos, por acción de las enzimas producidas por las bacterias.

De manera general los resultados indican que al inicio de la fermentación los carbohidratos en forma de oligosacáridos, polisacáridos y monosacáridos no estaban completamente disponibles; por lo que el mejoramiento en la digestibilidad del almidón durante la fermentación puede ser relacionado a las propiedades enzimáticas de la microbiota fermentadora que lleva a cabo la ruptura de los oligosacáridos del almidón (Kohajdová, 2015), así como la hidrólisis del almidón, por lo que al poder asimilarlo mejor las bacterias comenzaron a consumirlo rápidamente para su multiplicación.



En el caso de la fermentación natural y la inoculada con *L. lactis* existieron dos fases de consumo de carbohidratos totales, la primera donde fue muy rápido debido a que en este periodo de la fermentación los microorganismos se encontraban en pleno desarrollo, por lo que los azúcares fueron utilizados rápidamente y en gran cantidad. La segunda fase fue más lenta ya que las poblaciones microbianas disminuyeron su desarrollo, debido a las condiciones que se fueron generando en el medio.

En las cuatro fermentaciones se observó de forma general un descenso de la concentración de carbohidratos, esto se debe posiblemente a que conforme se fue hidrolizando el almidón se formaron carbohidratos de más fácil digestión para los microorganismos, los cuales fueron metabolizados por los mismos para formar los ácidos orgánicos. También se debe considerar la alta carga microbiana presente desde el inicio de la fermentación; para el caso de las inoculadas principalmente, lo que ayudó a un mayor consumo de los sustratos.

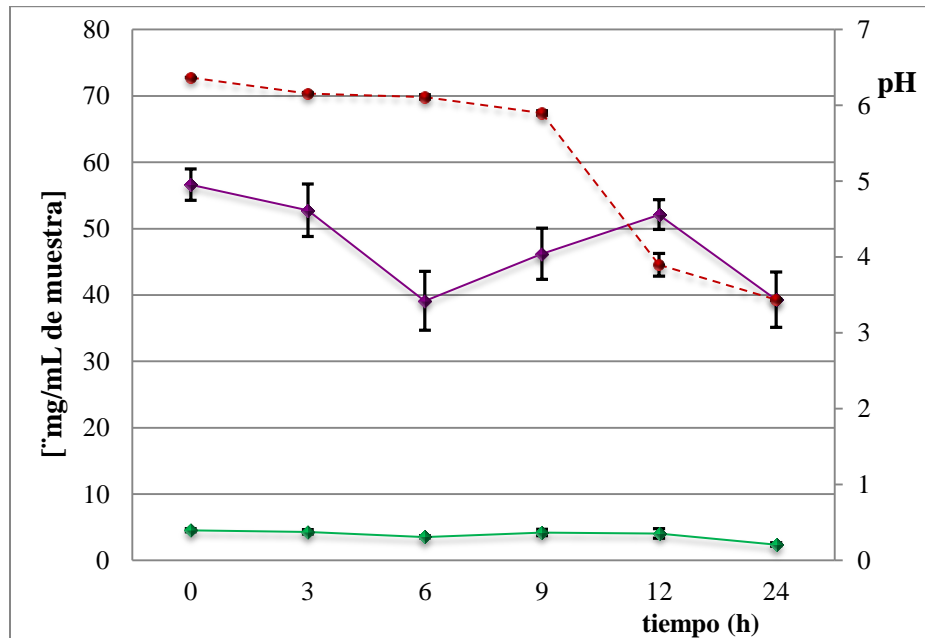


Figura 7.2.4.1. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio. Carbohidratos totales (línea morada), carbohidratos reductores (línea verde) y valores de pH (línea punteada en rojo).

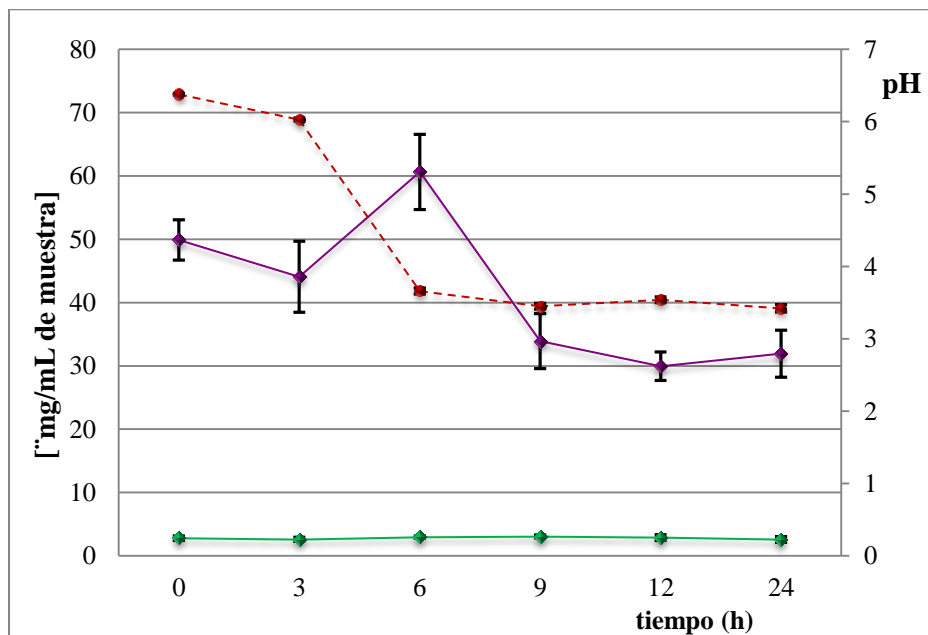


Figura 7.2.4.2. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación inoculada con *L. lactis* (A1MS3) del atole agrio. Carbohidratos totales (línea morada), carbohidratos reductores (línea verde) y valores de pH (línea punteada en rojo).



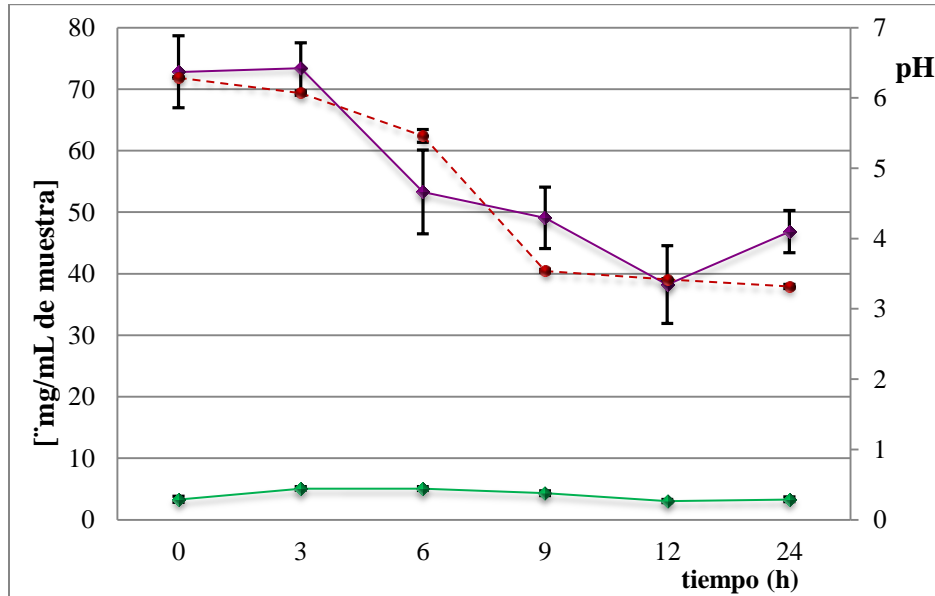


Figura 7.2.4.3. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10) del atole agrio. Carbohidratos totales (línea morada), carbohidratos reductores (línea verde) y valores de pH (línea punteada en rojo).

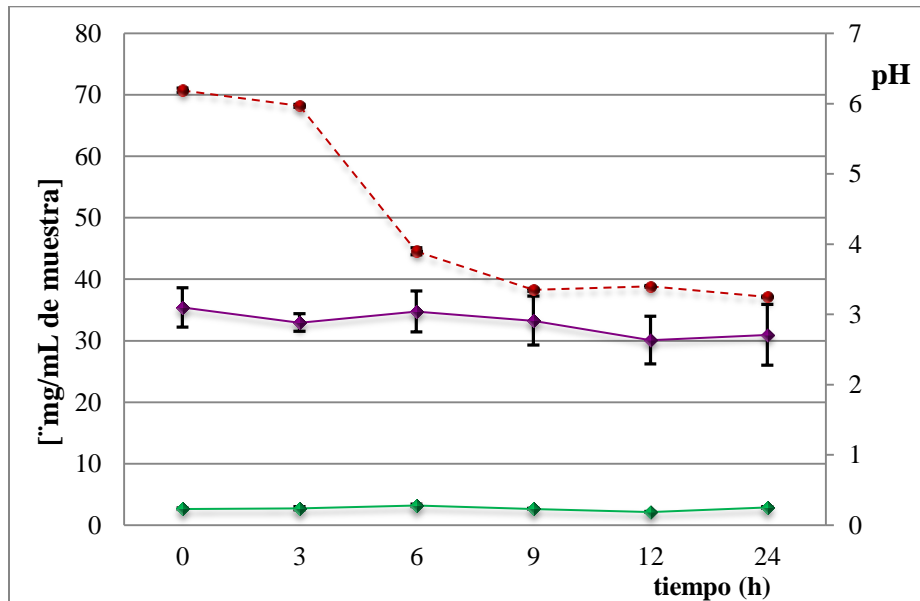


Figura 7.2.4.4. Concentración de carbohidratos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con *L. lactis* (A1MS3) y *P. pentosaceus* (Sol10) del atole agrio. Carbohidratos totales (línea morada), carbohidratos reductores (línea verde) y valores de pH (línea punteada en rojo).



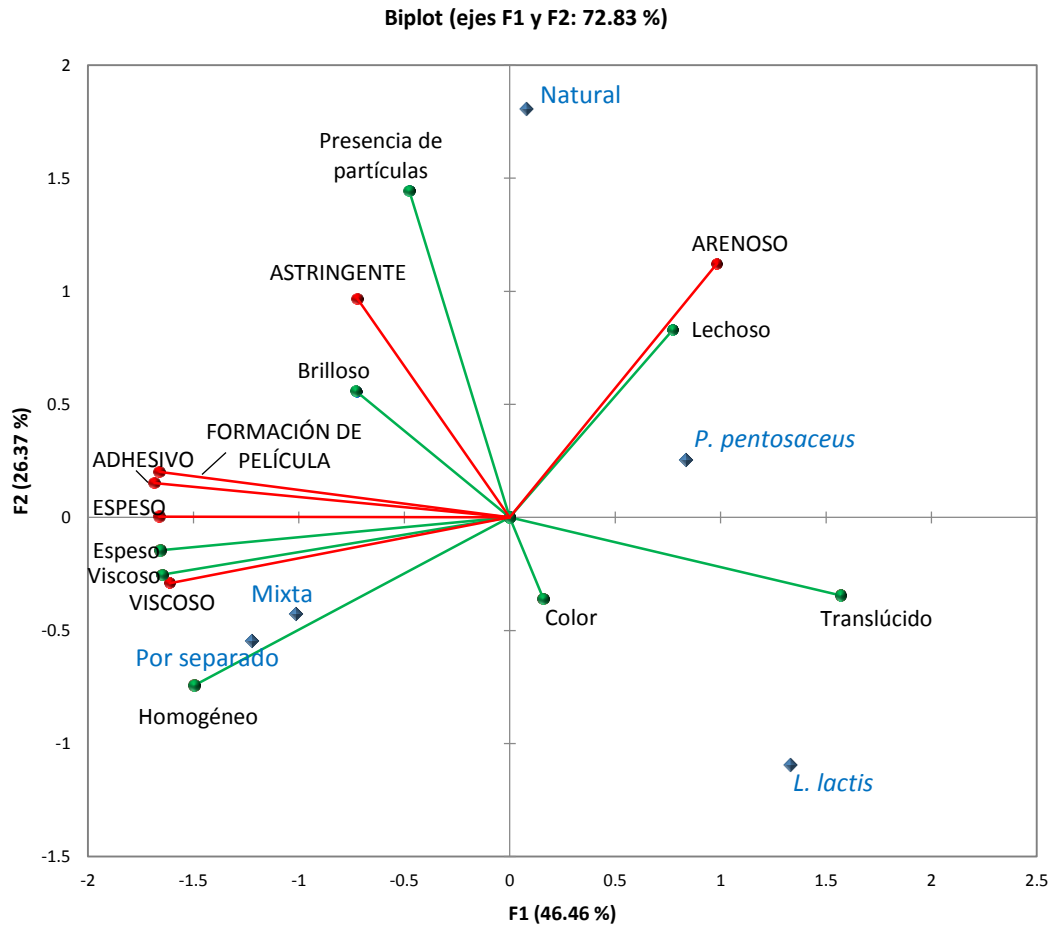
### 7.3 Perfil sensorial del atole agrio

Además del crecimiento de microorganismos y del consumo del sustrato, es importante conocer las características sensoriales del producto. Se analizaron 5 muestras: fermentación natural, fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3), fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), atole inoculado con el cultivo mixto de ambas y mezclando el atole producido por cada una de las bacterias. Se usó la metodología del Análisis Generalizado de Procrustes.

En la Figura 7.3.1 se muestra la representación gráfica de los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) para los atributos de apariencia y textura. En ella se observó que el componente 1 (F1) explicó el 46.46% de la variabilidad de las muestras y el componente 2 (F2) el 26.37% de la variabilidad, entre ambos componentes explicaron el 72.83% del total de la variabilidad de las muestras.

Correlacionadas positivamente al componente 1 (F1), se encuentran las muestras de *Pediococcus pentosaceus* y la *Lactococcus lactis*, así como la fermentación natural. La muestra con *P. pentosaceus* (Sol10) y la natural están caracterizadas por tener una textura arenosa y una apariencia lechosa. Por su parte, la muestra inoculada con *L. lactis* (A1MS3) se caracteriza por tener una apariencia translúcida y tener color.

Por otro lado correlacionadas negativamente se encontraron la muestra de la fermentación mixta y la muestra de la mezcla por separado de las fermentaciones inoculadas con *L. lactis* y *P. pentosaceus*. Ambas se caracterizan por tener una apariencia viscosa, espesa y homogénea, así como una textura viscosa. En general existe reproducibilidad entre las muestras, pero hay diferencia entre los tipos de atole agrio.



Nota: los atributos de apariencia aparecen con líneas en color verde, los atributos de textura aparecen con líneas en color rojo.

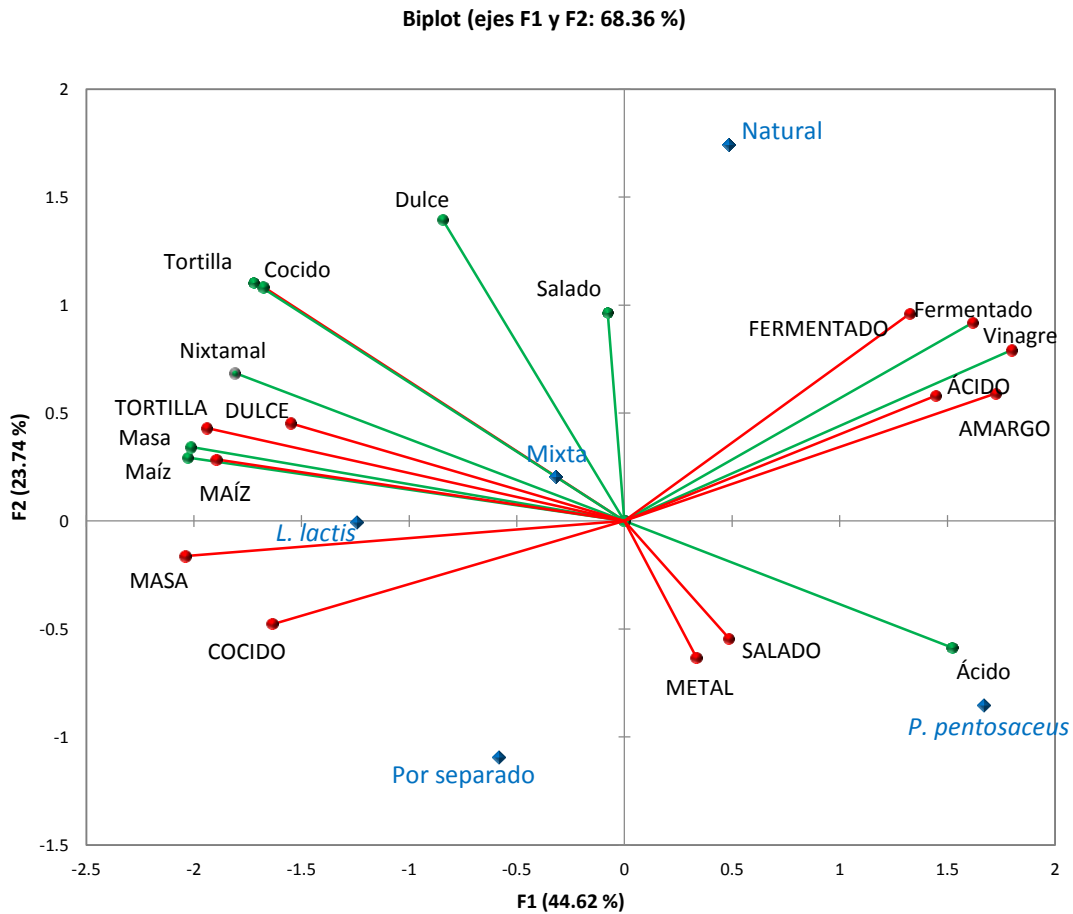
**Figura 7.3.1. Análisis Generalizado de Procrustes (GPA): atributos de apariencia y textura de las muestras de atole agrio. Atole sin inocular (Natural), atole inoculado con *Lactococcus lactis* (A1MS3), inoculado con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), inoculado con ambas cepas (Mixta) y la mezcla de los atoles fermentados por cada una de las bacterias (por separado).**



En la Figura 7.3.2 se muestra la representación gráfica de los resultados del PCA para los atributos de olor y sabor. En ella se observó que el componente 1 (F1) explicó el 44.62% de la variabilidad de las muestras y el componente 2 (F2) el 23.74% de la variabilidad, entre ambos componentes explicaron el 68.36% del total de la variabilidad de las muestras.

Correlacionadas positivamente al componente 1 (F1), se encuentran las muestras de la fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10), así como la fermentación natural. La muestra de la “fermentación natural” se caracterizó por tener un olor a fermentado y a vinagre, además de la presencia de tres sabores: fermentado, ácido y amargo; mientras que la muestra inoculada con *P. pentosaceus* obtuvo únicamente un olor ácido y en el caso del sabor presentó tanto uno metálico como salado.

Por otro lado correlacionadas negativamente se encontraron la muestra con fermentación mixta, la muestra de la mezcla por separado de los atoles inoculados con *L. lactis* y *P. pentosaceus* y la muestra inoculada con *L. lactis* (A1MS3). Ambas muestras se caracterizan únicamente por tener un sabor a masa y cocido. La fermentación mixta por otro lado fue la que más atributos registró, presentándose olor a masa, maíz, nixtamal, cocido, dulce y salado; mientras que tenía sabor a maíz, tortilla y dulce. En general se puede decir que hay reproducibilidad entre las muestras, pero diferencia entre los tipos de atole agrio.



Nota: los atributos de olor aparecen con líneas en color verde, los atributos de sabor aparecen con líneas en color rojo.

**Figura 7.3.2. Análisis Generalizado de Procrustes (GPA): atributos de olor y sabor de las muestras de atole agrio. Atole sin inocular (Natural), atole inoculado con *Lactococcus lactis* (A1MS3), inoculado con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10), inoculado con ambas cepas (Mixta) y la mezcla de los atoles fermentados por cada una de las bacterias (por separado).**



## 8. CONCLUSIONES

Se logró obtener atole agrio a partir de cultivos puros de las cepas de *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) en condiciones controladas. Después de analizar los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las fermentaciones de atole agrio, se concluyó que:

El uso de cultivos iniciadores ayudó a controlar las fermentaciones; ya que el descenso del pH fue más rápido y en el caso de la fermentación con *Pediococcus pentosaceus* se inhibieron las enterobacterias.

Las dos cepas, tanto *Lactococcus lactis* como *Pediococcus pentosaceus*, en cultivo mixto y puro son capaces de crecer y de dominar dentro de la microbiota natural del sustrato. Con *Pediococcus pentosaceus* se obtuvo una mayor concentración final de ácido láctico, por lo que la inhibición de enterobacterias fue mayor.

Según los resultados del análisis sensorial, existe reproducibilidad entre las muestras de atole agrio estudiadas, pero se encontraron diferencias entre ellas; ya que cada una presentó una descripción diferente para los atributos de apariencia, textura, olor y sabor evaluados.



## 9. PERSPECTIVAS

1. Estudiar de manera más profunda la interacción que existe entre las cepas de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*, para saber si existe algún tipo de competencia o inhibición para su desarrollo.
2. Realizar una prueba de comparación de los atributos generados con cada una de las muestras estudiadas con respecto a los obtenidos con el atole agrio tradicional.
3. Realizar pruebas de nivel de agrado para conocer cual es el producto obtenido por las diferentes fermentaciones realizadas con las cepas de *L. lactis* y *P. pentosaceus*, que resulta de mayor agrado para los consumidores.
4. Buscar alguna forma de mejorar las características sensoriales del atole que se elija como el más adecuado para el consumo humano.
5. Producción de atole agrio utilizando otras cepas aisladas, para analizar su comportamiento durante la fermentación; desde los parámetros fisicoquímicos hasta los sensoriales y compararlo con las que ya fueron empleadas.



## 10. ANEXO

### 10.1 Comparación de los valores de acidez titulable (% ácido láctico) de las fermentaciones.

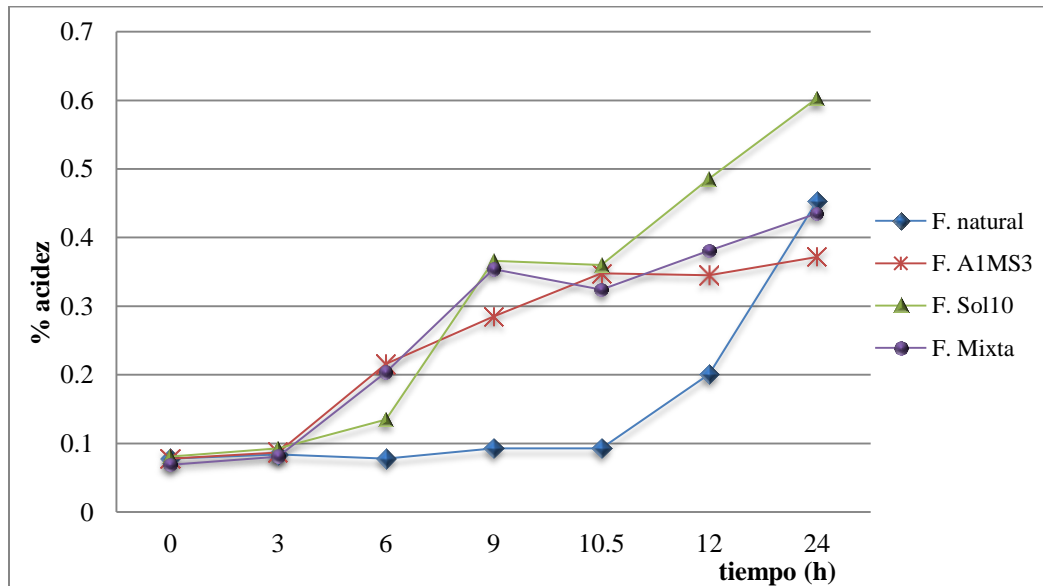


Figura 10.1.1. Valores de acidez titulable (% ácido láctico) de la fermentación natural, fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3), fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) y fermentación mixta, inoculada con ambas cepas, del atole agrio.

### 10.2 Crecimiento de microorganismos en las fermentaciones

Cuadro 10.2.1. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación natural del atole agrio (logUFC/mL).

Tiempo (h)	Mesófilos aerobios	Bacterias lácticas	Enterobacterias	Hongos	Levaduras	pH
0	3.447 ±0.119	3.255 ±0.050	3.255 ±0.014	2.954 ±0.080	3.114 ±0.131	6.37
3	6.176 ±0.087	6.176 ±0.108	4.477 ±0.116	1 v.e. ±0	4.519 ±0.206	6.16
6	9.279 ±0.039	9.146 ±0.114	8.176 ±0.043	3 ±0	6.146 ±0.082	6.11
9	11.462 ±0.617	13.114 ±0.085	10.255 ±0.038	3 ±0	8 ±0.093	5.90
12	13.362 ±0.108	13.756 v.e. ±0.525	6.447 v.e. ±0.058	2 ±0	2 ±0	3.90
24	14.362 ±0.039	14.699 ±0.251	3.491 ±0.627	1 ±0	1 ±0	3.44

v.e. = valor estimado, debido a que no fue posible hacer la cuenta con las diluciones inoculadas. Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.





**Cuadro 10.2.2. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) del atole agrio (logUFC/mL).**

Tiempo (h)	Mesófilos aerobios	Bacterias lácticas	Enterobacterias	Hongos	Levaduras	pH
0	8.041 ±0.362	7.954 ±0.293	3.322 ±0.173	2.954 ±0.256	3 ±0.063	6.38
3	11.477 ±0.141	11.415 ±0.065	3.041 ±0.111	2.301 ±0.751	1 ±0	6.03
6	13.114 ±0.188	12.58 ±0.090	3.903 ±0.030	2 ±0	2 ±0	3.66
9	12.431 ±0.146	12.431 ±0.157	3.301 v.e. ±0.174	2 ±0	2 ±0	3.45
12	12.146 ±0.128	12.114 ±0.071	1.826 v.e. ±0.131	1 ±0	1.602 v.e. ±0.310	3.54
24	11.279 v.e. ±0.187	10.778 ±0.494	2 ±0.125	1 ±0	1 ±0	3.42

v.e. = valor estimado, debido a que no fue posible hacer la cuenta con las diluciones inoculadas. Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

**Cuadro 10.2.3. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación inoculada con *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) del atole agrio (logUFC/mL).**

Tiempo (h)	Mesófilos aerobios	Bacterias lácticas	Enterobacterias	Hongos	Levaduras	pH
0	5.903 v.e. ±0	6 v.e. ±0.177	3.176 ±0.091	4.114 ±0.105	3.643 ±0.021	6.29
3	11.301 ±0.066	11.176 ±0.087	3.362 ±0.230	1 ±0	3.146 ±0.115	6.07
6	11.505 ±0.065	11.681 ±0.020	2.447 ±0.095	1.602 v.e. ±0.348	2.436 ±0.089	5.46
9	12.255 ±0.059	12.322 ±0.033	3.204 ±0.576	3 ±0	3.477 v.e. ±0.392	3.54
12	12.114 ±0.095	12.041 ±0.161	1.114 v.e. ±0.174	1 ±0	1 ±0	3.42
24	9.903 ±0.233	10.544 ±0.027	2.462 ±0.137	1 ±0	1.602 v.e. ±0.088	3.32

v.e. = valor estimado, debido a que no fue posible hacer la cuenta con las diluciones inoculadas. Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

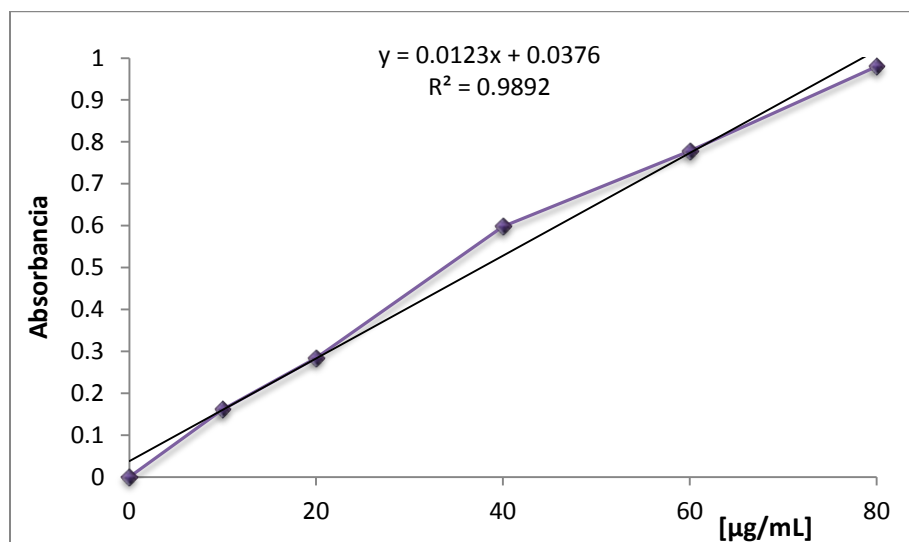


**Cuadro 10.2.4. Concentración de microorganismos y valores de pH en la fermentación mixta inoculada con *Lactococcus lactis* (A1MS3) y *Pediococcus pentosaceus* (Sol10) del atole agrio (logUFC/mL).**

Tiempo (h)	Mesófilos aerobios	Bacterias lácticas	Enterobacterias	Hongos	Levaduras	pH
0	6.845 ±0.194	6.968 ±0.214	4.041 ±0.533	1 ±0	4.623 ±0.083	6.19
3	10 v.e. ±0.667	8.919 ±0.210	5 ±0.474	1 ±0	5.279 v.e. ±0.079	5.97
6	12.447 ±0.216	12.462 ±0.174	4.924 ±0.326	2 ±0	2.778 v.e. ±0.411	3.90
9	12.633 ±0.103	12.908 ±0.038	2.012 v.e.±0.024	2 ±0	2 ± 0	3.35
12	10 v.e.±0.032	10.643 ±0.119	4.146 ±0.654	1 ±0	3.447 ±0.022	3.40
24	10.845 ±0.144	10.591 ±0.228	5.491 v.e.±0.157	1 ±0	1 ±0	3.25

v.e. = valor estimado, debido a que no fue posible hacer la cuenta con las diluciones inoculadas. Nota: los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

### 10.3 Concentración de carbohidratos durante las fermentaciones



**Figura 10.3.1. Curva patrón del método de Fenol-Sulfúrico para obtener la concentración de carbohidratos totales.**

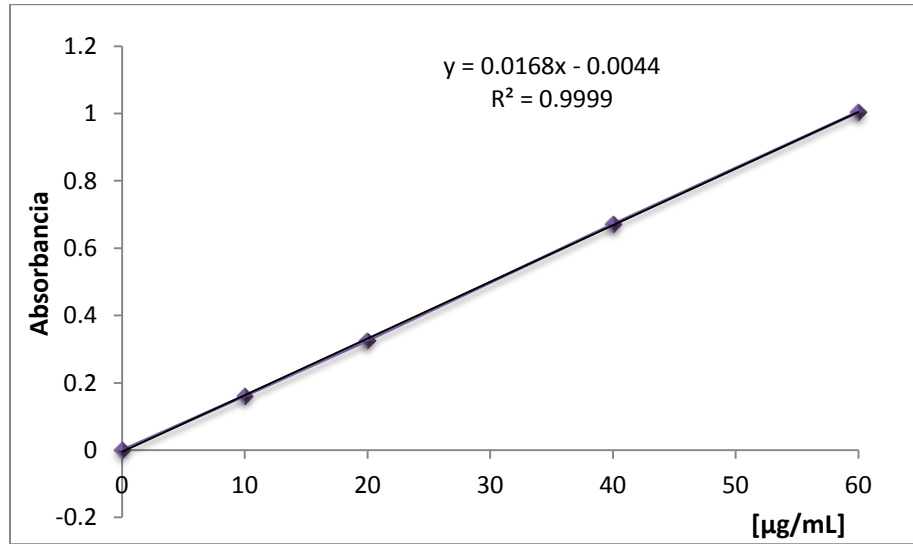


Figura 10.3.2. Segunda curva patrón del método de Fenol-Sulfúrico para obtener la concentración de carbohidratos totales.

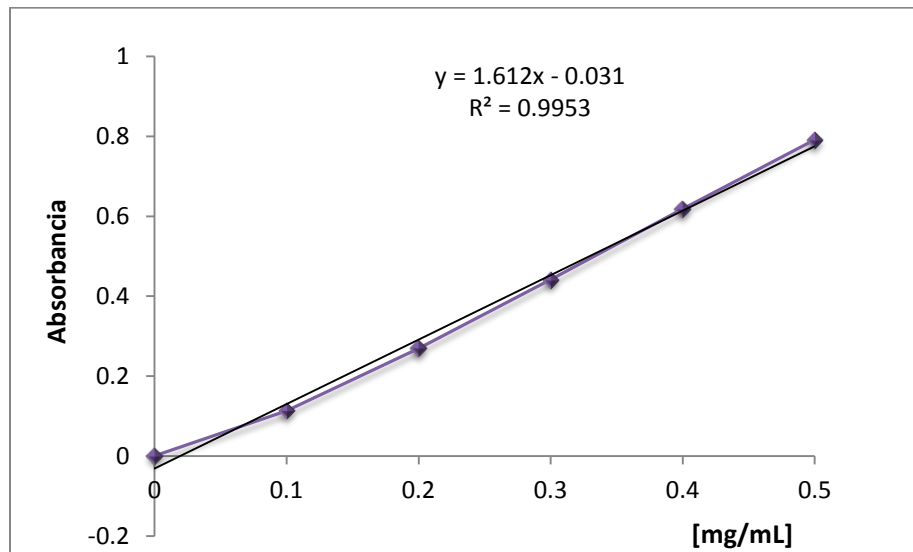


Figura 10.3.3. Curva patrón del método de DNS para obtener la concentración de carbohidratos reductores.



**Cuadro 10.3.1. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH durante la fermentación natural del atole agrio.**

Tiempo (horas)	0	3	6	9	12	24
<b>C. Totales</b>	56.634±2.366	52.774±3.947	39.111±4.432	46.211±3.858	52.114±2.236	39.298±4.161
<b>C. Reductores</b>	4.554±0.247	4.291±0.336	3.563±0.178	4.218±0.498	4.074±0.725	2.394±0.262
<b>pH</b>	6.37±0.00	6.16±0.01	6.11±0.03	5.90±0.03	3.90±0.15	3.44±0.01

Nota: Los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

**Cuadro 10.3.2. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación inoculada con *L. lactis* (A1MS3) del atole agrio.**

Tiempo (horas)	0	3	6	9	12	24
<b>C. Totales</b>	49.890±3.202	44.077±5.625	60.643±5.952	33.916±4.326	29.951±2.271	31.935±3.709
<b>C. Reductores</b>	2.792±0.358	2.595±0.318	2.947±0.187	3.040±0.224	2.885±0.454	2.568±0.466
<b>pH</b>	6.38±0.01	6.03±0.02	3.66±0.04	3.45±0.04	3.54±0.04	3.42±0.05

Nota: Los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

**Cuadro 10.3.3. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación inoculada con *P. pentosaceus* (Sol10) del atole agrio.**

Tiempo (horas)	0	3	6	9	12	24
<b>C. Totales</b>	72.817±5.851	73.447±4.097	53.311±6.808	49.095±4.998	38.238±6.327	46.831±3.434
<b>C. Reductores</b>	3.319±0.483	5.097±0.292	5.069±0.305	4.342±0.385	3.052±0.265	3.325±0.392
<b>pH</b>	6.29±0.01	6.07±0.03	5.46±0.09	3.54±0.02	3.42±0.01	3.32±0.03

Nota: Los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.

**Cuadro 10.3.4. Concentración de carbohidratos totales y reductores, con respecto a los valores de pH en la fermentación mixta inoculada con *L. lactis* (A1MS3) y *P. pentosaceus* (Sol10) del atole agrio.**

Tiempo (horas)	0	3	6	9	12	24
<b>C. Totales</b>	35.426±3.204	32.952±1.431	34.769±3.328	33.268±3.978	30.109±3.888	30.956±4.947
<b>C. Reductores</b>	2.667±0.146	2.742±0.261	3.201±0.208	2.668±0.088	2.153±0.093	2.885±0.107
<b>pH</b>	6.19±0.03	5.97±0.02	3.90±0.05	3.35±0.02	3.40±0.01	3.25±0.01

Nota: Los valores son un promedio de tres fermentaciones realizadas ± desviación estándar.



#### **10.4 Fundamento del método de Fenol-Sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales**

Virtualmente todas las clases de carbohidratos reaccionan con estos reactivos y producen un color estable. Los métodos que usan fenol son llevados con un ácido fuerte como reactivo, que puede hidrolizar oligosacáridos y polisacáridos (Southgate, 1991); además de que bajo condiciones de hidrólisis ácida estos mismos producen monosacáridos.

Los carbohidratos serán destruidos por el calor y el ácido; ya que son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar. Empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida, se producen derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos oscuros o compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos, como son el fenol, resorcinol, orcinol,  $\alpha$ -naftol, y naftoresorcinol que producen compuestos coloridos para el análisis de carbohidratos (BeMiller, 2003).

#### **10.5 Fundamento del método de DNS para la determinación de carbohidratos reductores**

Para la determinación del contenido de azúcares reductores solubles se ha utilizado el ácido dinitrosalicílico (DNS), como reactivo sensible a los productos de reacción (Carrillo, 2002). El procedimiento se fundamenta en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra (Bello, Carrera & Díaz, 2006)

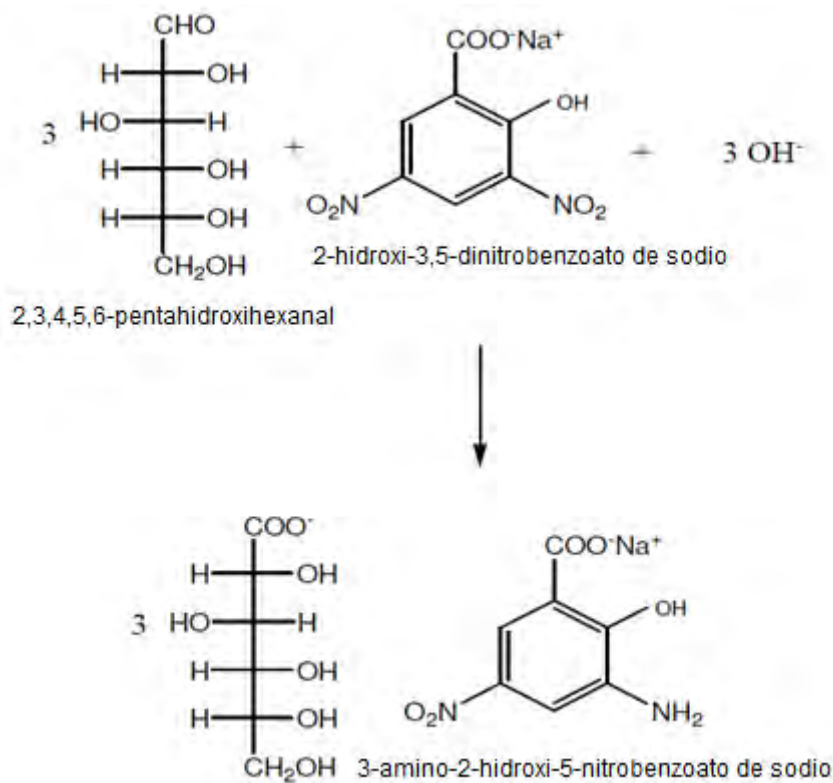
El reactivo consiste en una disolución formada por los siguientes compuestos: ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico), que actúa como oxidante; Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), que impide la disolución de oxígeno en el reactivo y el hidróxido sódico, que aporta el medio requerido para que se produzca la reacción redox. De esta forma el ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico se reduce, en presencia del grupo reductor de la glucosa,



formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico (Carrillo, 2002).

En este método analítico el DNS está en exceso frente a los grupos reductores y en todas las muestras se adiciona la misma cantidad, de tal forma que mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra (Carrillo, 2002).

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Fuente: Nielsen, 1998



## **10.6 Métodos empleados para la evaluación sensorial del atole agrio**

### **10.6.1 Perfil Flash**

El Perfil Flash es una metodología que tiene como objetivo proporcionar un rápido acceso a la posición sensorial relativa de un conjunto de productos. El Perfil Flash involucra dos sesiones principales y una sesión intermedia. En la primer sesión se presenta un conjunto de muestras simultáneamente a cada uno de los jueces, a quienes se les pide que observen, huelan, y/o prueben los productos (dependiendo de los objetivos del estudio) para que generen la mayor cantidad de atributos posibles, donde los jueces son libres de utilizar los términos descriptivos deseados evitando vocabulario hedónico (De la Garza, 2016).

En la sesión intermedia, una vez que se generaron los atributos de cada uno de los jueces se crea una lista grupal, la cual es proporcionada a cada uno de los panelistas para que actualicen su lista individual; es decir, que añadan o eliminen terminología de ésta. Ya sea que encuentren descriptores importantes que no lograron identificar o reemplazar algún descriptor que crean que es más adecuado para la descripción. Lo que se busca es que los jueces utilicen un vocabulario con el que se encuentren familiarizados. Finalmente en la segunda sesión los panelistas clasifican los productos para cada atributo (De la Garza, 2016).

### **10.6.2 Análisis Generalizado de Procrustes (AGP)**

Técnica estadística multivariada que busca el mejor consenso entre los jueces, mediante la transformación de los espacios individuales en tres pasos: traslación, escalamiento y rotación-reflexión (De la Garza, 2016):

- 1) **Traslación:** desplazar las configuraciones de cada juez a un centro común (origen); con el propósito de ajustar las diferencias de uso de la escala entre los jueces.
- 2) **Escalamiento:** encogimiento o estiramiento de las configuraciones de cada uno de los jueces para que tengan un tamaño similar. Consiste en un cambio de escala uniforme.



- 3) Rotación-reflexión: proceso mediante el cual cada configuración es rotada o reflejada (imagen especular), en este ajuste se toma en cuenta que el panel empleó diferentes atributos para referirse al mismo producto. De esta manera se permite saber si los términos empleados por todos los jueces se realizó de la misma forma.

El AGP iguala los términos/atributos y la escala utilizada en el uso del vocabulario por los panelistas (De la Garza, 2016).

### **10.6.3 Preference Mapping**

Entre los métodos estadísticos que se han desarrollado para relacionar el nivel de agrado a perfiles sensoriales como lo son las técnicas de Preference Mapping o Mapas de Preferencia. Existen dos variantes: Internal Preference Mapping (IPM); que es un análisis de resultados hedónicos donde los productos (observaciones) y consumidores (variables) reflejan la preferencia sobre algún producto. Y el External Preference Mapping (EPM); es una regresión individual de la preferencia de los consumidores la cual se relaciona con los datos descriptivos sensoriales o instrumentales (García, 2016).

Este tipo de análisis es un mapa perceptual que describe que atributos contribuyen en las preferencias del consumidor usando la relación de los juicios hedónicos de los consumidores y una matriz de datos sensoriales descriptivos. El IPM se enfoca en las calificaciones de nivel de agrado y es una aplicación del Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre estas calificaciones de preferencias. El análisis resulta en un espacio multidimensional el cual se enfoca en dos componentes. Los consumidores son representados como vectores y los productos como puntos. Los vectores indican la dirección de agrado para cada sujeto. Así se puede identificar la preferencia de cada grupo de consumidores en relación a otro (García, 2016).





## 10.7 Medios de cultivo

### ∞ Caldo APT (Difco™)

Base para el cultivo de *Weisella viridescens* ATCC™ 12706 usado en el ensayo de Tiamina; para el cultivo de lactobacilos heterofermentativos y otros organismos que requieren un alto contenido de tiamina. Especialmente adecuado para el cultivo de bacterias del ácido láctico (Muntaner, 1981).

Formula (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Extracto de levadura	7.5
Digerido pancreático de caseína	12.5
Dextrosa	10.0
Citrato de sodio	5.0
Clorhidrato de Tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Polisorbato 80	0.2

pH = 6.7 ± 0.2

### ∞ Caldo MRS (Difco™)

Base para el cultivo de lactobacilos.

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de proteasa No. 3	10.0
Extracto de res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	2.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0

pH = 6.5 ± 0.2



Suspender 55 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

### ∞ Medio semisólido APT

Medio sin inhibidores para recuperar a los microorganismos. Ser realizó en medio semisólido para que sea un medio con poco O<sub>2</sub> para el crecimiento de las bacterias, ya que son microaerófilas o anaerobias facultativas. Se colocó una punta de espátula de carbonato de calcio para neutralizar el pH del medio.

Formula (g/L)

Componente	Cantidad g
Agar bacteriológico	3.0
Medio APT	46.2
Carbonato de calcio	-

Suspender el medio de cultivo y el agar bacteriológico en 1L de agua destilada, mezclar, calentar con agitación constante y hervir 1 minuto para disolver completamente. Vaciar 4 mL del medio disuelto en viales de vidrio de 8 mL con tapón de rosca. Agregar una pequeña cantidad de Carbonato de calcio. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### ∞ Agar (Bacto™)

Agente solidificante con material extraño, partes pigmentadas y sales reducidos al mínimo.



### ∞ Agar MRS (Difco™)

Base para el aislamiento, enumeración y cultivo de Lactobacilos.

Formula (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de proteasa No. 3	10.0
Extracto de res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0
Agar	15.0

pH = 6.5 ± 0.2

Suspender 70 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

### ∞ Agar cuenta en placa (Difco™)

Base para el recuento de bacterias en agua, aguas de desecho, alimentos y productos lácteos.

Formula (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Digerido pancreático de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0

pH = 7.0 ± 0.2

Suspender 23.5 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.



### ∞ Agar papa dextrosa (BD Bioxon)

Para identificación, cultivo y recuento de levaduras y hongos.

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Almidón de papa (Infusión de papa sólidos)	4.0
Dextrosa	20.0
Agar	15.0

pH = 5,6 ± 0.2

Suspender 39 g del polvo en 1L de agua destilada disolver completamente. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

### ∞ Agar bilis rojo violeta con glucosa (OXOID)

Medio para el aislamiento y la diferenciación de enterobacterias (Muntaner, 1981).

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3.0
Peptona	7.0
Cloruro de sodio	5.0
Sales biliares No.3	1.5
Glucosa	10.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.002
Agar	12.0

pH = 7.4 ± 0.2

Suspender 38.5 g del polvo en 1L de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. No es necesario ni recomendable una anterior esterilización. Mezclar bien y repartir en placas.



### ∞ Agua peptonada al 0.1%

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario. Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento (“Agua Peptonada”, 2008).

Formula típica (g/L)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0

pH = 7.2 ± 0.2

Suspender 15 gramos del polvo en 1 L de agua destilada. Mezclar y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 10.8 Técnica de conservación de cepas

- 1) Verificar pureza de cepa por siembra en caja.
- 2) Transferir a medio líquido.
- 3) Tomar 1.5 mL de cultivo y transferir a un Eppendorf estéril.
- 4) Centrifugar 10 minutos, 10,000 rpm.
- 5) Retirar sobrenadante (si sobró medio, repartirlo equitativamente en los viales).
- 6) Agregar 1.5 mL de Solución salina a cada Eppendorf.
- 7) Resuspender y centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm para lavar las células (2 veces).
- 8) Retirar el sobrenadante, agregar 0.75 mL de medio con glicerol (20%) y resuspender.
- 9) Transferir al criovial estéril y agregar 0.75 mL más del medio con glicerol.
- 10) Agitar bien.
- 11) Congelar a -65°C.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

*Agua Peptonada*. (2008). Britanialab.com.ar. [En línea] (Actualizado al 23 de julio de 2008). Disponible en:

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/aguapep.htm> [Último acceso el 19 de septiembre de 2016].

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: S. Salminen & A. Wright, *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed., pp. 1-29. New York: Marcel Dekker.

Belitz, H. D. & Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. Segunda Edición. Zaragoza: Acribia. pp. 725-756.

Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA* No. 2, 45-50.

BeMiller, J. N. (2003). Carbohydrate Analysis. Chapter 10. En: S. Nielsen, *Food Analysis*. 3rd ed., pp. 148-149. New York: Kluwer Academic/Plenum publishers.

Benítez, C. G., & Pfeiffer, H. (2006). El maíz: origen, composición química y morfología. *Materiales Avanzados*, 7, 15-20.

Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36 (6), 527-543.

Calderón-Villagómez, A. (1993). Bebidas y alimentos fermentados entre los choles: estudio etno-histórico, microbiano y químico (proyecto de investigación). En: M del C. Wachter y P. Lappe, *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. pp. 57-62. UNAM, México, D.F.

Campbell-Platt, G. (2014). Fermented foods. Origins and Applications. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 834-838.



Carrillo, F. (2002). Estudio del comportamiento de la fibra Lyocell frente a la hidrólisis enzimática con celulasas. Capítulo IV. En: *Caracterización estructural de fibras Lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya UPC. [En línea] (Actualizado al 16 de agosto de 2016). Disponible en:

<http://www.tdx.cat/handle/10803/6428> [Último acceso el 16 de agosto de 2016].

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 131-141.

Cocconceli, P.S. Coordinator. (2013). *Functional aspects of Latinamerican fermented foods*. Final report. Marie Curie Actions, project Microandes.

Corsetti, A., Perpetuini, G., & Tofalo, R. (2015). Biopreservation effects in fermented foods. En: W. Holzapfel, *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. pp. 311-332. Cambridge: Woodhead Publishing, Elsevier.

Cruz, S., & Ulloa, M. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Rev. Soc. Hist. Nat.* 34, 423-457.

De la Garza, D. M. A. (2016). *Perfil sensorial de vinos blancos mexicanos: cepas chenin blanc, sauvignon blanc y silvaner*. Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM.

Dendy, D. A. & Dobraszezyk, B. J. (2001). *Cereales y productos derivados. Química y tecnología*. Zaragoza: Acribia. pp. 1, 389-391.

Dirección General de Normas. *NMX-F-511-1988. Alimentos. Determinación de acidez en leche reconstituida. Foods. Acidity determination in reconstituted milk. Normas Mexicanas*. [En línea] (Actualizado al 18 de febrero de 2010). Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-511-1988.PDF> [Último acceso el 20 de noviembre de 2015].



*El maíz en la nutrición humana. Composición química y valor nutritivo del maíz.* (2016). FAO.org. [En línea]. (Actualizado al 24 de junio de 2016). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm> [Último acceso el 24 de junio de 2016].

Esquivel, A. (2012). *Estudio de las enterobacterias presentes en atole agrio de Villahermosa, Tabasco.* Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM

García, J. A. (2016). *Internal preference mapping de quelites de diferentes regiones de México.* Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM

Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos.* Tomo II. Segunda edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana. pp. 128-129.

Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G., & Webb, C. (2000). Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry*, 36, 127-130.

Guadarrama, K. D. (2007). Tipificación de bacterias lácticas aisladas del axocotl, atole agrio de la Sierra Norte de Puebla, por medio de ARDRA. Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl): 374S-9S.

Herrera, T. (1993). Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En: M del C. Wachter y P. Lappe, *Alimentos Fermentados Indígenas de México.* pp. 21-27. UNAM, México, D.F.

Holzappel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.





Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197-212.

Hoseney, R. C. (1991). *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. España: Acribia. pp. 16-19.

Ingraham, J., Ingraham, C., Prentiss, H., Nieto, J., Quesada, E., & Ventosa, A. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Barcelona: Editorial Reverté. pp. 734.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Microbiología moderna de los alimentos*. Quinta edición. Zaragoza: Acribia. pp. 22-41.

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

Kohajdová, Z. (2015). Fermented cereal products. En: R. Ray y D. Montet, *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. pp. 78-107. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger & Woods. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color*. Sexta edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.

Mendoza, E. & Calvo, M. de la C. (2010). *Bromatología. Composición y propiedades de los alimentos*. México: Mc Graw Hill Interamericana, pp. 221-223.

Muntaner. (1981). *Medios de Cultivo para Microbiología*. Barcelona. Edita: ADSA=MICRO.

Muñoz, R., Moreno-Arribas, V., & Rivas, B. (2011). Lactic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*, Chapter 8. 191-226.



Nielsen, S. (1998). *Food Analysis*. 2nd ed. Gaithersburg, Maryland: An Aspen Publication.

Norma Oficial Mexicana. *NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. [En línea] (Actualizado al 18 de diciembre de 2003).

Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html> [Último acceso el 20 de noviembre de 2015].

Norma Oficial Mexicana. *NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. [En línea] (Actualizado al 03 de abril de 2003).

Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html> [Último acceso el 20 de noviembre de 2015].

Norma Oficial Mexicana. *NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*. [En línea] (Actualizado al 03 de abril de 2003). Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html> [Último acceso el 20 de noviembre de 2015].

Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4, 47-55.

Ouwehand, A. C., & Röytiö, H. (2015). Probiotic fermented foods and health promotion. En: W. Holzapfel, ed. *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Cambridge: Woodhead Publishing, Elsevier, pp. 1-20.

Paredes, O., Guevara, F. & Bello, L. A. (2006). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. México: Fondo de Cultura Económica. pp. 20-27.



Paredes, O., & Valverde, M.E. (2006). Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Cinvestav*, 65-73.

Parra, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, Vol. 8, No. 1, 93-105.

Peyer, L. C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 17-25.

Ramírez, J. C., Rosas, P., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, Año 2, No. 7. 1-7.

Ray, B. & Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. Cuarta edición. México, D.F.: Mc Graw-Hill Interamericana. pp. 70-81.

Ray, R. C., & Joshi, V. K. (2015). Fermented foods: past, present and future. En: R. Ray y D. Montet, *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. pp. 1-36. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

Rodríguez, J. M. (2006). *Microorganismos y salud. Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas*. Madrid: Editorial Complutense. pp. 1.

SAGARPA. (2011). *Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional*. [En línea] (Actualizado al 19 de enero de 2011). Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios\\_promercado/granos.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/granos.pdf) [Último acceso el 24 de junio de 2016].

Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centurión D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A. & 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.



Southgate, D. A. T. (1991). *Determination of food carbohydrates*. 2nd ed., pp. 44-46, 68-70 y 136- 138. Nueva York: Elsevier Applied Science.

Stainer, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. & Painter, P. R. (1992). *Microbiología*. Segunda edición. España: Editorial Reverté.

Steinkraus, K. H. (1993). Alimentos fermentados del mundo. En: M del C. Wacher y P. Lappe, *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. pp. 5-10. UNAM, México, D.F.

Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in World Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1 (1), 23-32.

Todorov, S. D., & Holzapfel, W. H. (2015). Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. En: W. Holzapfel, *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. pp. 123-153. Cambridge: Woodhead Publishing, Elsevier.

Torres, K. (2015). *Estudio de la fermentación láctica dirigida del atole agrío de Villahermosa, Tabasco*. Reporte de estancia estudiantil. UNAM

Vâkevâinen K., U. de Europa Oriental, Kuopio, Finlandia, comunicación personal.

Valderrama, P., & Ramírez, C. (1993). Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. En: M del C. Wacher y P. Lappe, *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. pp. 63-67. UNAM, México, D.F.

Valderrama, A. (2012). *Diversidad de bacterias lácticas del atole agrío de Villahermosa, Tabasco*. Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM

Wacher, M. & Lappe, P. (1993). *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. UNAM, México, D.F. Dirección General de Publicaciones.

Watson, S. A. (1987). Structure and composition. En S. A. Watson y P. E. Ramstad, *Corn: chemistry and technology*, pp. 53-82. St Paul, EE.UU., Am. Assoc. Cereal Chem.