



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FISICOQUÍMICO DE LA FERMENTACIÓN EN MASA DE NIXTAMAL USANDO *STREPTOCOCCUS INFANTARIUS* SUBSP. *INFANTARIUS* AISLADA DEL POZOL Y DE LA FERMENTACIÓN DIRIGIDA DE MASA SIN NIXTAMALIZAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KARLA CLAUDIA TORRES GUTIÉRREZ



CIUDADA DE MÉXICO,

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: Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte

VOCAL: Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Aleida Mina Cetina

1er. SUPLENTE: Hugo Antonio Hernández Pérez

2° SUPLENTE: Dra. Gloria Díaz Ruiz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

SUSTENTANTE:

KARLA CLAUDIA TORRES GUTIÉRREZ



Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas.....	8
Resumen	10
Introducción	11
Antecedentes.....	14
Alimentos fermentados	14
Alimentos fermentados tradicionales	15
Alimentos fermentados tradicionales de México	16
Alimentos fermentados a base de cereales.....	18
Tipos de fermentación	19
Fermentación espontánea.....	19
Fermentación dirigida	20
Bacterias ácido lácticas (BAL)	21
Fermentación homofermentativa.....	22
Fermentación heterofermentativa	25
Atole agrio “de dobla”	27
Método de elaboración	27
Microbiología del atole agrio.....	29
El pozol	29
Método de elaboración	30
Microbiología del pozol	33
Probióticos	34



<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> (Sii)	36
Justificación	38
Hipótesis	40
Objetivo general.....	41
Objetivos específicos	41
Metodología	42
Metodología empleada en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas usando masa de maíz sin nixtamalizar (atole agrio).	44
Maíz usado y su tratamiento.	44
Tratamiento de la muestra.	44
Cultivo iniciador.	45
Preparación de inóculo.	45
Fermentación.	45
Pruebas microbiológicas.	46
Determinación de pH.	47
Determinación de acidez total titulable.	47
Determinación de carbohidratos reductores.	48
Determinación de carbohidratos totales.....	48
Metodología empleada en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas usando masa de maíz nixtamalizado (pozol).....	49
Tratamiento de la muestra.	49
Cultivo iniciador.	49
Preparación del inóculo.	50



Ajuste de pH de masa de nixtamal.....	50
Fermentación.....	50
Análisis microbiológicos.....	50
Determinación de pH.....	51
Determinación de acidez total titulable.....	51
Determinación de carbohidratos reductores.....	52
Determinación de carbohidratos totales.....	52
Resultados y discusión.....	53
Conclusiones.....	67
Perspectivas.....	68
Bibliografía.....	69
Apéndice 1.....	76
Apéndice 2.....	78
Apéndice 3.....	80
Apéndice 4.....	81



Índice de figuras

Figura 1.- Fermentación homoláctica.....	24
Figura 2.- Fermentación heteroláctica	26
Figura 3.- Diagrama de elaboración del atole agrio	28
Figura 4.- Diagrama de elaboración del pozol.	32
Figura 5.- Metodología general llevada a cabo para el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz sin nixtamalizar.....	42
Figura 6.- Metodología general llevada a cabo para el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz nixtamalizado	43
Figura 7.- Maíz de Tehuacán, Puebla.....	44
Figura 8.- Concentración de bacterias lácticas y valores de pH en la fermentación natural y dirigida con bacterias lácticas (<i>Lactococcus lactis</i> y <i>Pediococcus pentosaceus</i>) en masa de maíz sin nixtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla.	56
Figura 9.- Valores de pH y porcentaje de acidez titulable en muestra control de masa de nixtamal.....	57
Figura 10.- Concentración de bacterias lácticas, <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> (<i>Sii</i>) y valores de pH en la fermentación dirigida en masa de nixtamal incubada a 30°C.	58
Figura 11.- Valores de pH y porcentaje de acidez titulable en fermentación de <i>Sii</i> dirigida en masa de nixtamal	60
Figura 12.- Crecimiento de bacterias lácticas en muestras control masa de maíz de Tehuacán, Puebla y masa de nixtamal estéril de Villahermosa, Tabasco.....	61



Figura 13.- Concentración de bacterias lácticas y valores de pH en fermentación dirigidas en masa de maíz nixtamalizado y sin nixtamalizar 62

Figura 14.- Variación de la concentración de azúcares reductores durante la fermentación control y dirigida en masa de maíz sin nixtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla. 63

Figura 15.- Variación de la concentración de azúcares reductores durante la fermentación de masa de nixtamal control e inoculada..... 64

Figura 16.- Concentración de azúcares totales solubles durante la fermentación control y dirigida de masa de maíz sin nixtamalizar usando maíz de Tehuacán, Puebla. 65

Figura 17.- Variación de la concentración de azúcares totales solubles durante la fermentación de masa de nixtamal control e inoculada..... 66

Figura 18.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 1) 76

Figura 19.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 2) 77

Figura 20.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 3) 77

Figura 21.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 10 (Curva 1) 78

Figura 22.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 10 (Curva 2) 79



Índice de tablas

Tabla 1.- Alimentos fermentados tradicionales a base de maíz	15
Tabla 2.- Distribución en México de algunas bebidas fermentadas de maíz	19
Tabla 3.- División de las especies de <i>Lactobacillus</i> en Grupos I, II y III	22
Tabla 4.- Medios y condiciones de cultivo utilizados para la cuantificación de los distintos grupos microbianos, características de las colonias contadas y el intervalo de cuenta usado para tener cuentas significativas.	46
Tabla 5.- Concentración de microorganismos (UFC/mL), valores de pH y acidez durante la fermentación natural de maíz de Tehuacán, Puebla. .	54
Tabla 6.- Concentración de microorganismos (UFC/mL), valores de pH y acidez durante la fermentación dirigida del atole agrio elaborado con maíz de Tehuacán, Puebla, inoculada con los cultivos iniciadores A1MS3 y la Sol 10.	54
Tabla 7.- Cuantificación de microorganismos en la muestra control de masa de nixtamal sin inocular e incubada a 30°C	56
Tabla 8.- Cuantificación de microorganismos en masa de nixtamal inoculada con <i>Streptococcus infantaris</i> subsp. <i>infantarius</i> (Sii) cepa 11.	59
Tabla 9.- Datos de curvas estándar de glucosa para azúcares reductores.	76
Tabla 10.- Datos de curvas estándar de glucosa para azúcares totales solubles.....	78
Tabla 11.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación natural de masa de maíz sin nixtamalizar (Atole agrio).	80



Tabla 12.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas de masa de maíz sin nixtamalizar (Atole agrio).....	80
Tabla 13.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado estéril (Pozol).....	81
Tabla 14.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación dirigida con bacteria lácticas de masa de maíz nixtamalizado estéril (Pozol).	81



Resumen

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México se encuentra el pozol, de origen maya, ácida, no alcohólica, hecha a base de maíz nixtamalizado; el nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso. Otra bebida de gran importancia es el atole agrio (del náhuatl *xocoatolli*; *xococ*: agrio, *atolli*: atole), es elaborado con una masa de maíz de doble, no nixtamalizado y fermentado, se caracteriza por tener un sabor ácido, lo cual lo hace una bebida refrescante; existen dos maneras de elaborar atole agrio: la sólida y la líquida.

En el presente trabajo se estudió el comportamiento microbiológico y fisicoquímico durante la fermentación de dos alimentos, uno elaborado a partir de nixtamal y otro a partir de maíz; para ello se realizó una fermentación de masa de maíz de Tehuacán, Puebla simulando la fermentación de atole agrio y una fermentación de masa de nixtamal estéril e inoculada con una bacteria aislada del pozol (*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124).

Se vio la posibilidad de dirigir una fermentación natural mediante la inoculación con una bacteria láctica, por lo que se realizó una fermentación de maíz de Tehuacán, Puebla inoculado con *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus* las cuales son nativas del atole agrio y se siguió la actividad de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* en la fermentación de masa de maíz nixtamalizado mediante pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, para conocer el intervalo de tiempo en el cual los cambios producidos por la fermentación son significativos.



Introducción

Los alimentos fermentados datan de la prehistoria, donde la fermentación era de gran importancia para su conservación, mediante la observación y la experimentación fue que nuestros antepasados descubrieron esta técnica, la cual consiste en la modificación de las materias primas como frutas, cereales, vegetales o carnes, entre otras, mediante la acción de diversos microorganismos. A través de reacciones metabólicas, principalmente de los azúcares de estos alimentos, permiten la formación de ácidos orgánicos como: acético, láctico, butírico y propiónico, y de algunos alcoholes como el etanol, así como la liberación de algunos aminoácidos. Estas reacciones tienen como consecuencia modificaciones en el alimento, relacionadas con su sabor, olor, textura o color (Wacher, 2014).

Estos alimentos empezaron a producirse cuando aún no se conocían los microorganismos; sin embargo, siguiendo ciertas formas de elaboración y de almacenamiento se desarrollaban microorganismos de la microbiota natural, de manera que los primeros alimentos fermentados deben haber sido naturales o espontáneos. Posteriormente se usaron fracciones del alimento fermentado para inocular el sustrato y después de conocer que eran microorganismos los que llevaban a cabo estos procesos, se estudiaron y se encontraron los microorganismos responsables de las principales modificaciones en los sustratos. Entonces inició la adición directa de cultivos iniciadores selectos para dirigir las fermentaciones alimentarias, lo cual permite un buen control del proceso fermentativo y, además, favorece la estandarización de los productos finales.



México es un país con gran diversidad cultural y biológica; cuenta con alimentos muy variados, entre ellos, los alimentos fermentados tradicionales que se consumen hoy en día.

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México se encuentra el pozol, bebida de maíz de origen maya, ácida, no alcohólica, hecha a base de maíz nixtamalizado; que forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México: chontales, choles, mayas, lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, mames y zapotecos, junto con la población mestiza. El nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso (Wacher, 2014). Esta bebida ha sido utilizada desde la época prehispánica como ofrenda de ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz; hasta la fecha se ha usado no sólo como alimento básico, sino también con fines medicinales para controlar diarreas y reducir la fiebre (Ulloa, et al. 1987).

La microbiota del pozol es compleja, se han encontrado gran diversidad de bacterias, mohos y levaduras. Las principales bacterias que se encuentran en todo el proceso de elaboración son las ácido lácticas. Se han realizado estudios que demuestran que ciertas especies de bacterias que han sido aisladas del pozol tienen potencial probiótico (Rodríguez y Villalba, 2010).

Otra bebida de gran importancia es el atole agrio (del náhuatl *xocoatolli*; *xococ*: agrio, *atolli*: atole) el cual es una bebida del estado de Tabasco, consumida por diversos grupo indígenas y mestizos, es elaborado con una masa de maíz de dobla, no nixtamalizado y fermentado, se caracteriza por tener un sabor ácido, lo cual lo hace una bebida refrescante; existen



dos maneras de elaborar atole agrio: la sólida y la líquida (Valderrama, 2012).

En esta bebida se ha encontrado una microbiota compleja. Se han descrito bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas, enterobacterias, levaduras y mohos. Se han aislado e identificado bacterias lácticas de diferentes etapas de la fermentación (Valderrama, 2012).



Antecedentes

Alimentos fermentados

La fermentación es el proceso metabólico anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan et al., 2008).

Se define a un alimento fermentado como aquél que tiene alojada una gran cantidad de microorganismos cuyas enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas hidrolizan los polisacáridos, proteínas o lípidos dando como resultado productos no tóxicos, con aromas, sabores y texturas que son atractivas para el consumo humano (Steinkraus, 2002).

La fermentación mejora el contenido nutritivo de los alimentos, ya que produce vitaminas, aminoácidos esenciales y hace más digeribles las proteínas y las fibras, proporciona micronutrientes y degrada los factores antinutritivos. También proporciona calorías al convertir sustratos inadecuados para el consumo humano en alimentos inocuos. Los métodos de fermentación mejoran la inocuidad de los alimentos al reducir los compuestos tóxicos como las aflatoxinas y los cianogénicos, y producir factores antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas, bióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol, que facilitan la inhibición o eliminación de los patógenos de los alimentos. También se ha informado que los alimentos fermentados tienen propiedades terapéuticas (FAO, 1998).

Recientemente se ha encontrado que además de las características anteriores, algunos microorganismos en los alimentos fermentados tienen



actividad probiótica. Los probióticos son organismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del huésped (FAO, 2001).

La producción de alimentos fermentados también es importante para sumar valor a las materias primas agrícolas, y así proporciona ingresos y crea empleos (FAO, 1998).

Alimentos fermentados tradicionales

Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen sin añadir inóculos, por lo que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento y están constituidos por microbiotas complejas (Díaz y Wachter, 2003). El proceso involucra la acción de hongos, levaduras y bacterias. Estos alimentos son un recurso enorme de microorganismos y algunos de ellos tienen características probióticas. Estos alimentos se han preparado y consumido por cientos de años y están fuertemente asociados a culturas y tradiciones de millones de personas alrededor del mundo, especialmente en comunidades rurales (Tabla 1). Los alimentos fermentados son componentes importantes de la dieta como alimento básico, complemento de la alimentación básica, condimentos y bebidas (Wachter y Lappe, 1993).

Tabla 1.- Alimentos fermentados tradicionales a base de maíz (Modificado de Nout et al., 2007)

Producto	País (es) y/o área (s)	Sustratos	Microbiota funcional	Tipo de fermentación	Descripción
Banku	Egipto	Maíz o yuca	LAB, levaduras	FSS, N	Bola de masa
Bussa	Kenia, Uganda	Maíz, mijo africano	LAB, levaduras	SmF, N	Bebida alcohólica ácida



Chicha	Sudamérica	Maíz	LAB, mohos, levaduras, bacterias acéticas	SmF, N	Bebida alcohólica ácida, efervescente, translúcida, amarillenta
Kenkey	Ghana	Maíz	LAB, levaduras	SSF, N	Bola de masa, cocida
Mahewu	Sudáfrica	Maíz	LAB	SmF, N	Bebida no alcohólica, ácida
Mawé	Benin, Congo	Maíz	LAB, levaduras	SSF, N	Masa ácida convertida en atole o molida
Munkoyo	Zambia, Zaire	Maíz	LAB, levaduras	SmF, N	Bebida alcohólica dulce, ácida
Ogi	Nigeria, Oeste África	Maíz, sorgo o mijo	LAB, bacterias acéticas, mohos y levaduras	SmF, N	Hojuelas ácidas
Poto-poto	Congo	Maíz	LAB, levaduras	SSF, N	Bolas de masa ácidas convertidas en atole y hojuelas
Pozol	México	Nixtamal	LAB, otras bacterias, mohos, levaduras	SSF, N	Bolas diluidas con agua para hacer una bebida ácida no alcohólica

LAB Bacterias ácido lácticas, SSF Fermentación semisólida, SmF Fermentación sumergida, N Fermentación Natural

Alimentos fermentados tradicionales de México

A pesar de que en su mayoría son poco conocidos, tienen importancia alimentaria social y económica para los grupos étnicos que regularmente los preparan y consumen, se trata de productos locales elaborados mediante métodos de fermentación transmitidos de generación en generación hasta la actualidad. Se elaboran a partir de sustratos amiláceos (maíz, sorgo, trigo, etc.) o azucarados (frutas, savia de algunas



plantas, etc.) y se consumen con diversos fines, pudiendo ser nutricionales, estimulantes, medicinales y/o ceremoniales. En la actualidad de toda la variedad de bebidas y alimentos fermentados existentes en nuestro país sólo algunos han sido objetivo de investigaciones microbiológicas y químicas y además de estudios étnico, antropológicos y sociales (Herrera, 1993).

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

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



Dentro de las bebidas y alimentos alcohólicos autóctonos de México están el pulque, tepache, colonche, tesgüino y balché; por otra parte entre los no alcohólicos de origen prehispánico, el pozol es tal vez el más importante (Herrera, 1993).

Alimentos fermentados a base de cereales

Los granos de cereal son considerados como uno de los más importantes grupos de alimentos, ya que tienen un alto aporte de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra. Sin embargo, su calidad nutricional y sensorial es muchas veces opacada cuando es comparada, por ejemplo con la leche o sus derivados (Gil, 2010).

En general, la fermentación natural de los cereales conduce a una disminución en el nivel de carbohidratos, así como algunos poli y oligosacáridos no digeribles. La fermentación provee también un óptimo pH para la degradación enzimática del fitato, que está presente en los cereales en la forma de un complejo polivalente catiónico de hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas; esta reducción del fitato puede incrementar la cantidad de hierro, zinc y calcio soluble. El efecto de la fermentación en los niveles de proteína y aminoácidos es un tema controvertido. Por ejemplo, durante la fermentación del maíz, las concentraciones de lisina, metionina y triptófano disponible aumentan (Haard et al., 1999).

Durante la fermentación de los cereales se forman una gran cantidad de compuestos volátiles representativos; ácido láctico, etanol, ácido acético, el propiónico y el butírico, el ácido diacetil acético, entre los ácidos grasos volátiles, además del succínico, el metano, hidrógeno y CO₂ (Blandino et al., 2003).



En México se elaboran una gran variedad de alimentos fermentados a base de maíz, éstos han sido examinados por Cruz-Ulloa (1973). Su distribución aproximada en México se muestra en la Tabla 2. Estos autores indican que 24 grupos étnicos tienen sus propios procesos de fermentación y cerca de la mitad de los procesos son no alcohólicos (probablemente lácticos).

Tabla 2.- Distribución en México de algunas bebidas fermentadas de maíz*

Bebidas alcohólicas		
Nombre	Estados	Grupos étnicos
Sendenchó	México, Michoacán	Mazahuas
Tepache	Sonora, Oaxaca	Pápagos, Triques, Mixtecos, Amuzgos, Chinantecos
Tesgüino	Oaxaca, Sonora, Chihuahua, Nayarit, Jalisco, Durango	Zapotecos, Pimas, Yaquis, Tarahumaras, Tepehuanos, Huicholes
Bebidas no alcohólicas		
Agua agria	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, D. F.	Nahuas
Atole	Guanajuato	Chichimeca-jonaz
Atole agrio	Oaxaca	Mazatecos
Pozol	Chiapas, Yucatán, Tabasco	Zoques, Lacandones, Mayas, Tzotziles, Tojolabales, Chontales

*Datos compilados por Cruz-Ulloa (1973).

Tipos de fermentación

Los microorganismos participantes de la fermentación pueden formar parte de la microbiota autóctona presente en el sustrato (fermentación espontánea) o pueden ser añadidos como cultivo iniciador (fermentación dirigida).

Fermentación espontánea

En muchos países en desarrollo, los alimentos fermentados se producen principalmente en el hogar utilizando métodos espontáneos de inoculación.



El proceso tradicional de fermentación suele ser una actividad espontánea, sin asepsia, producto de la acción conjunta de una variedad de microorganismos. Estos están presentes en los alimentos crudos, en la materia prima y en el entorno del procesamiento, actuando como inoculantes en fermentaciones espontáneas.

Fermentación dirigida

Actualmente, en la mayor parte de las fermentaciones industriales se **utilizan cultivos iniciadores o “starters”**. Estos podrían ser definidos como **“preparaciones microbianas que contienen un elevado número de células de al menos un microorganismo”** (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los cultivos iniciadores se utilizan para iniciar, conducir y acelerar la velocidad de los procesos de fermentación, reducir la variabilidad en la calidad, limitar el crecimiento de bacterias de descomposición y patógenas, y mejorar las cualidades sensoriales del producto (Talon y S. Leroy, 2014). La calidad y pureza de los cultivos iniciadores pueden variar considerablemente (FAO, 2010).

El diseño de cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos es un complejo proceso que requiere 1) un estudio ecológico de los ecosistemas naturales de fermentación para conocer la microbiota presente en los mismos, ya que las cepas allí presentes serán las mejor adaptadas a las condiciones del medio y 2) el estudio de las propiedades tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, para seleccionar aquéllas que presenten mejores propiedades para ser utilizadas a nivel industrial. Las propiedades deseables en estas cepas dependerán del tipo de producto a elaborar, y han sido descritas las que se usan en la elaboración de productos lácteos, cárnicos y vegetales. Finalmente, habrá que estudiar



la capacidad fisiológica de las cepas seleccionadas en el proceso industrial, para lo que será necesario utilizar técnicas de caracterización, como las moleculares, con gran capacidad discriminante a la vez que metodológicamente sencillas, para hacer un seguimiento de las cepas inoculadas (Seseña, 2007).

El desarrollo de cultivos iniciadores también ha sido una fuerza impulsora para la innovación en el diseño de equipos adecuados para el procesamiento higiénico de los alimentos fermentados tradicionales bajo condiciones controladas en una gran cantidad de países en desarrollo.

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos, Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramírez et al., 2011).

Dependiendo del tipo de metabolismo por el cual se obtiene el ácido láctico, estas pueden clasificarse en homofermentativas que solamente producen lactato como producto final de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas y heterofermentativas por producir lactato y etanol como productos finales mediante la vía de las pentosas; siendo las primeras las de mayor aplicación en la industria alimentaria. Como resultado de estas vías metabólicas, también se producen sustancias que le dan características deseables a los alimentos fermentados, tal es el caso del diacetilo,



acetaldehído y algunos compuestos que pueden tener implicaciones positivas en la salud de los consumidores como algunas vitaminas, antioxidantes y péptidos bioactivos. También se les considera como levemente proteolíticas aunque existen algunas excepciones (Caplice, 1999; Ross, 2002).

Fermentación homofermentativa

Cuando la lisis de carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para producir moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa, se denomina fermentación homofermentativa. Los géneros de bacterias que llevan a cabo este tipo de fermentación son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, así como el grupo I y II de *Lactobacillus* (Tabla 3) (Todar, 2011). Este género de bacterias posee la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, que es necesaria para hidrolizar hexosas y convertirlas en dos moléculas de tres carbonos cada una.

Tabla 3.- División de las especies de *Lactobacillus* en Grupos I, II y III

Tipo de fermentación	Homofermentador obligado	Heterofermentador facultativo	Heterofermentador obligado
Productos finales de fermentación	Lactato	Lactato y/o acetato, etanol, CO ₂ y formiato	Lactato, acetato, etanol y CO ₂
Especies representativas	<i>L. curvatus</i> <i>L. sake</i> <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> , <i>bulgaricus</i> , <i>lactis</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> , <i>rhamnosus</i> <i>pseudoplarum</i> <i>L. divergens</i> <i>L. kefir</i> <i>L. cofusus</i> <i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>

Tomado y modificado de Ray y Bhunia (2008)



En la vía EMP, con una glucosa como sustrato, dos moléculas de ATP son utilizadas para convertir glucosa a fructosa-1,6-difosfato. La hidrólisis de esta última, genera dos moléculas de tres carbonos, la cual sufre una deshidrogenación para formar dos moléculas de NADH+. Posteriormente hay una fosforilación a nivel de sustrato para producir dos moléculas de ATP y fosfoenolpiruvato (PEP), el cual es convertido en piruvato y finalmente en lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. La reacción global comprende la producción de dos moléculas de lactato y dos de ATP a partir de una molécula de glucosa (Figura 1) (Ray y Bhunia, 2008).

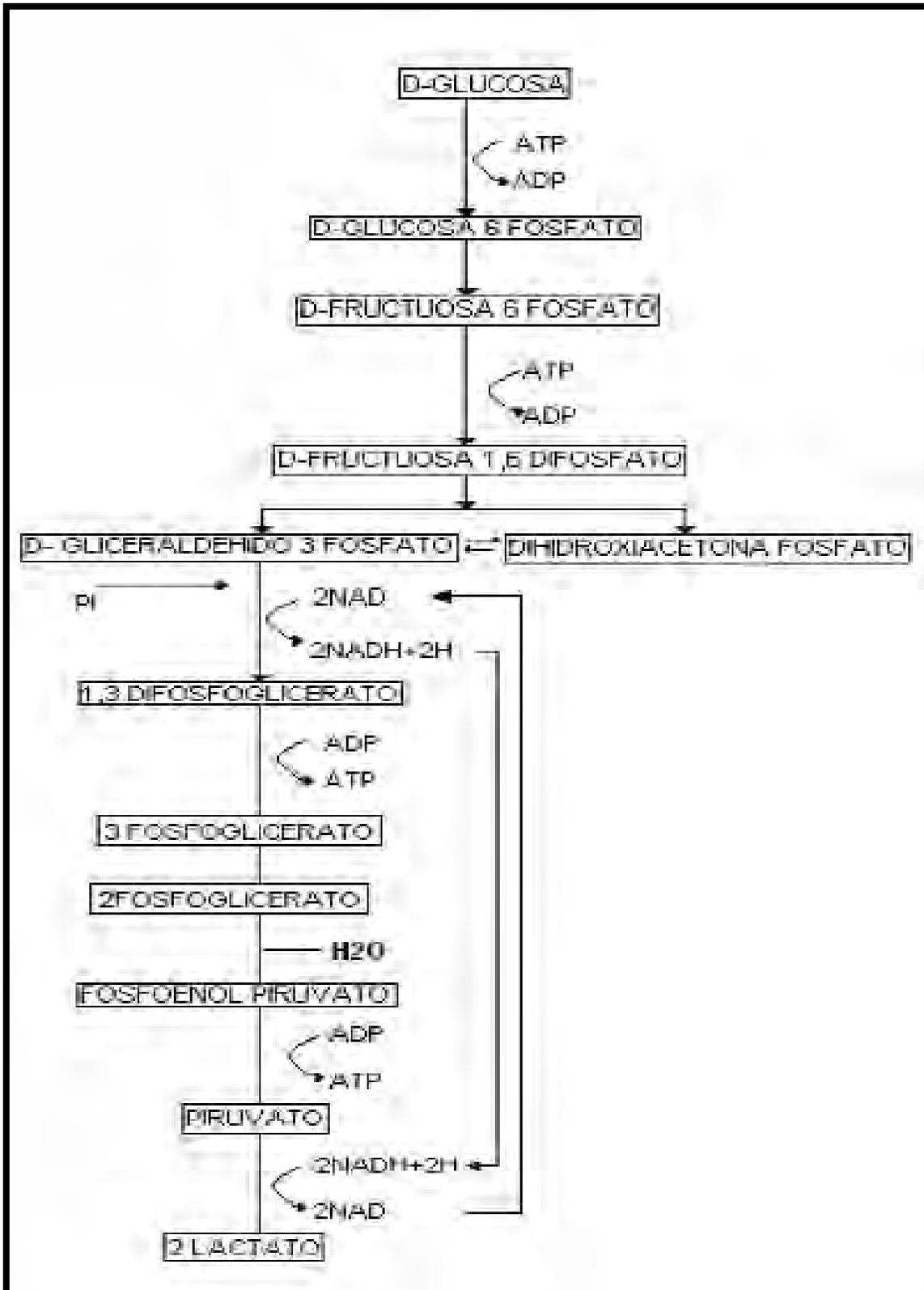


Figura 1.- Fermentación homoláctica (Parra, 2012)



Fermentación heterofermentativa

Este tipo de fermentación, las hexosas son metabolizadas para producir una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol. Los géneros reconocidos como heterofermentadores son *Leuconostoc*, el grupo III de *Lactobacillus* (Tabla 3), el género *Oenococcus* y *Weissella* (Todar, 2011). Estas bacterias no poseen la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, requerida en la vía EMP para formar las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato; sin embargo, poseen a la glucosa-fosfato-deshidrogenasa y a la xilulosa-fosfocetolasa, que les permite metabolizar a las hexosas a través de la vía de las Pentosas-fosfato para generar energía.

La vía de las Pentosas-fosfato consta de una fase inicial oxidativa, seguida de una no oxidativa. En la primera fase, la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato por la glucosa-fosfato-deshidrogenasa y luego descarboxilada para producir una molécula de CO₂ y una de ribulosa-5-fosfato. En la segunda fase (no oxidativa), este último compuesto es convertido a xilulosa-5-fosfato, mismo que a través de una hidrólisis produce una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y una acetil-fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato es subsecuentemente convertido en lactato, mientras que el acetil-fosfato puede ser oxidado para producir acetato, o reducido para generar etanol dependiendo del potencial de óxido-reducción que se encuentra en el ambiente (Figura 2) (Ray y Bhunia, 2008).

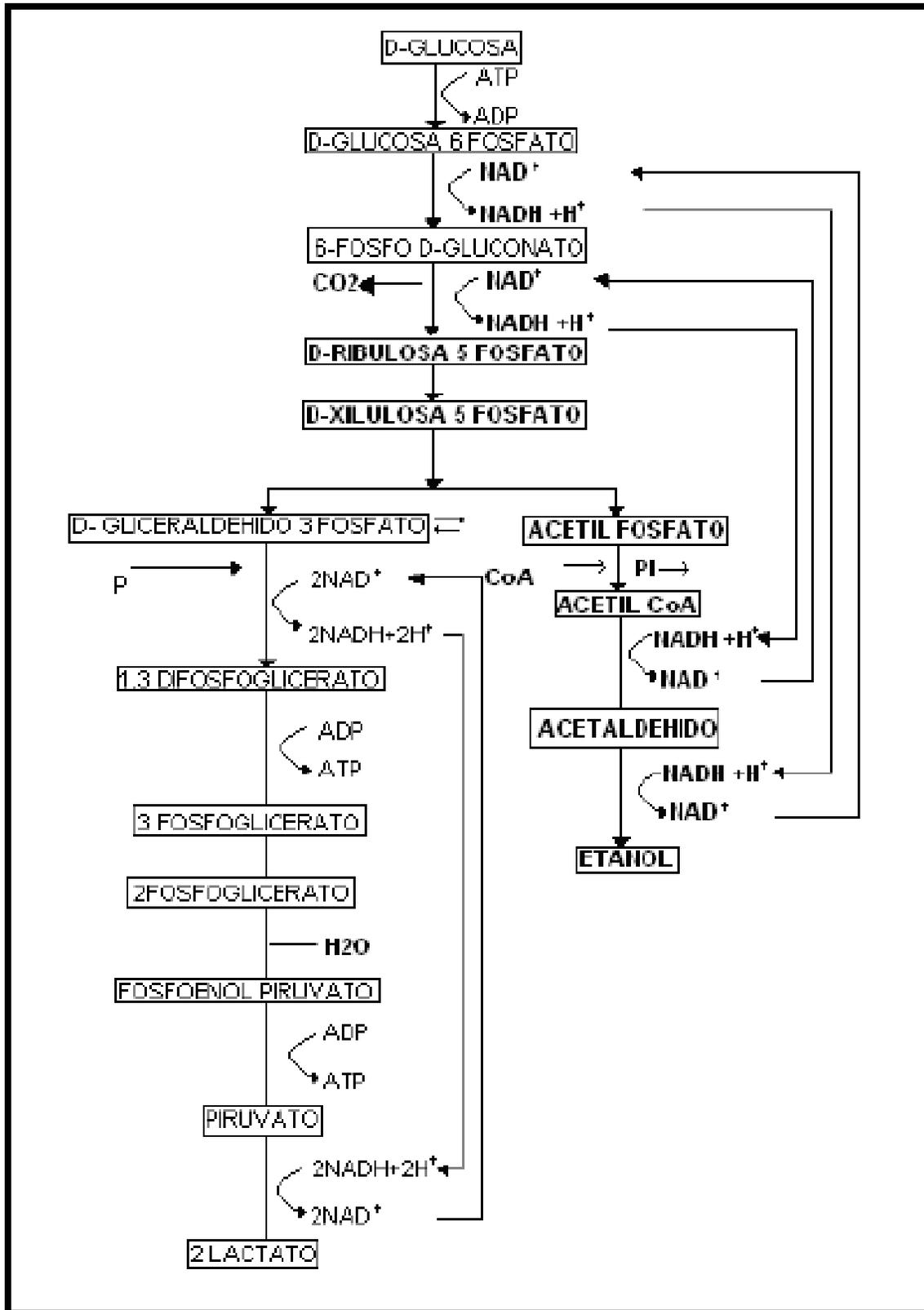


Figura 2.- Fermentación heteroláctica (Parra, 2012)



Atole agrio "de dobla"

Este atole agrio es una bebida del estado de Tabasco, consumida por diversos grupos indígenas y mestizos, es elaborado con una masa de maíz de dobla, joven, no maduro, no nixtamalizado y fermentado, se caracteriza por tener un sabor ácido, lo cual lo hace una bebida refrescante. Cabe mencionar que este atole solo se prepara en el periodo de dobla, en los meses de mayo y septiembre; la dobla es el procedimiento que consiste en doblar la parte superior de la planta o solamente la mazorca, para que la punta quede hacia abajo. Con esta práctica se pretende evitar que el agua de lluvia penetre al interior de la mazorca y por consecuencia evitar la acción de microorganismos (Valderrama, 2012).

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

Método de elaboración

Existen dos maneras de elaborar atole agrio: la fermentación sólida y la fermentación líquida (Figura 3).

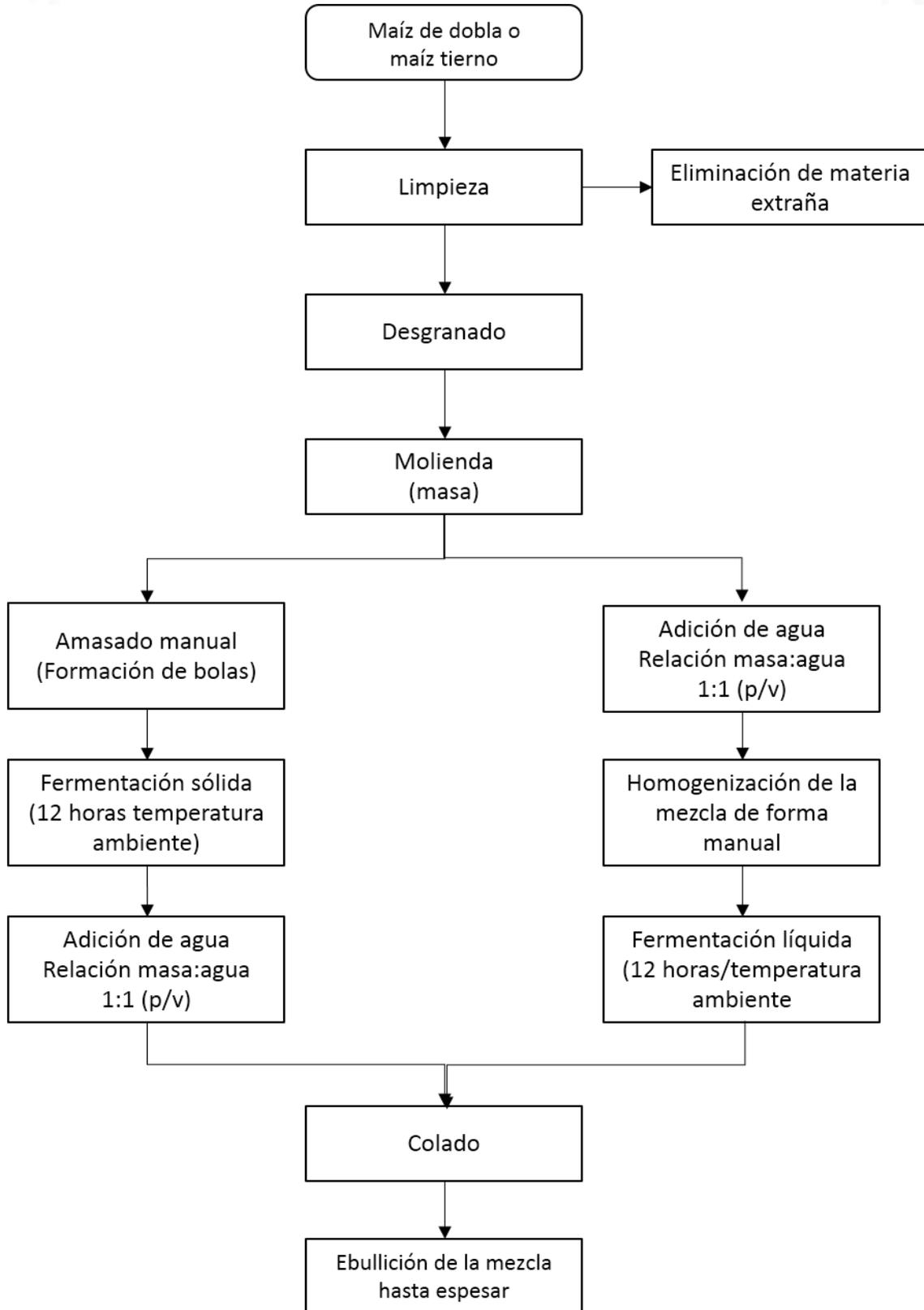


Figura 3.- Diagrama de elaboración del atole agrio (Valderrama, 2012)



Microbiología del atole agrio

En esta bebida se ha encontrado una microbiota compleja, se han descrito bacterias ácido lácticas, bacterias ácido lácticas amilolíticas, mesófilos aerobios totales, enterobacterias, levaduras y mohos. En el aislamiento e identificación de las bacterias lácticas en ambas fermentaciones (líquida y sólida) se ha identificado *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, siendo este último el que se identificó con mayor frecuencia, en la fermentación sólida se identificó también a *Lactobacillus plantarum* (Valderrama, 2012).

El microorganismo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se identificó durante el desarrollo de la fermentación sólida y líquida desde el inicio hasta el término de estas, de igual forma todas las cepas identificadas como amilolíticas corresponden a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* por lo anterior se asume que su presencia debe ser relevante para el proceso fermentativo (Valderrama, 2012); sin embargo, su hábitat más importante está en leche cruda, leche fermentada y quesos. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ya sea en forma pura o asociada con otros microorganismos, es la cepa más comúnmente usada como cultivo iniciador de productos lácteos (Jensen y Hammer, 1993; Salminen y Von Wright, 1993). Las cepas de *Lactococcus lactis* asociadas con productos vegetales se les ha prestado menos atención (Martinez-Cuesta et al., 1997, Van y Hahn Hagerdal, 1999).

El pozol

Es una bebida fermentada tradicional, ácida, no alcohólica y refrescante, hecha a base de maíz nixtamalizado y es de origen maya. Es consumida principalmente en el sureste de México. Se obtiene a partir de una fermentación natural, donde las bacterias lácticas son las primeras en crecer y se mantienen durante todo el proceso, éstas son responsables de la acidificación de la masa.



En la época prehispánica fue consumida como parte de la dieta, ingerida durante la jornada laboral, la comida o como bebida refrescante. Entre los mayas peninsulares aún se acostumbra beberlo en las ceremonias agrícolas.

Además de constituir un producto alimenticio importante, también se le han adjudicado ciertas propiedades medicinales. Entre los antiguos mayas, la masa se aplicaba en cataplasmas sobre las heridas para curar o prevenir infecciones. Actualmente, se ingiere mezclada con miel para bajar la fiebre, así como para el tratamiento de diarreas y otros padecimientos intestinales (Ulloa, et al. 1987).

Método de elaboración

Se prepara domésticamente para consumo familiar o en pequeña escala comercial para la venta en el mercado, de acuerdo con los procedimientos tradicionales empleados durante generaciones. En general, se elabora de la siguiente manera: el maíz preferiblemente blanco (*Zea mays L.*) se desgrana y aproximadamente 1 o 1½ kilogramos de éste se hierven en una olla por 1 a 2 h en agua con cal para tener aproximadamente una concentración del 1% de cal (p/v). Cuando los granos se hinchan y el pericarpio se desprende fácilmente, los granos se enfrían, se remojan en el agua de cocción, generalmente durante toda la noche, se enjuagan con agua y se drenan para obtener el llamado nixtamal. Éste se muele en un molino metálico manual o se lleva al molino de piedra comunitario, para obtener una masa que se moldea manualmente para obtener bolas. Las bolas se envuelven en hojas de plátano o bolsas de plástico para evitar la desecación y se fermentan a temperatura ambiente desde unas cuantas



horas o incluso hasta un mes o más, dependiendo del gusto de los consumidores (Steinkraus, 1995; Wachter et al., 2000).

Según el tipo de producto, la elaboración del pozol puede llevar o no una segunda cocción. El pozol indígena no comprende esta última, mientras que el pozol mestizo sí. Esta segunda cocción consiste en cocer el nixtamal en agua durante 3-8 horas hasta que el grano de maíz **“reviente”**, con el objetivo de que el producto final adquiriera una textura más tersa (Cañas, et al., 1993) (Figura 4).

Las bolas de maíz fermentado se consumen suspendidas en agua durante la comida, el trabajo o a cualquier hora del día como una bebida refrescante. Una variante de esta preparación llamada chorote, consiste en agregar granos de cacao molidos a la masa de maíz; también se puede añadir azúcar, miel de abeja, pulpa de coco o diferentes clases de chiles secos, tostados y molidos (Wachter, 2014).

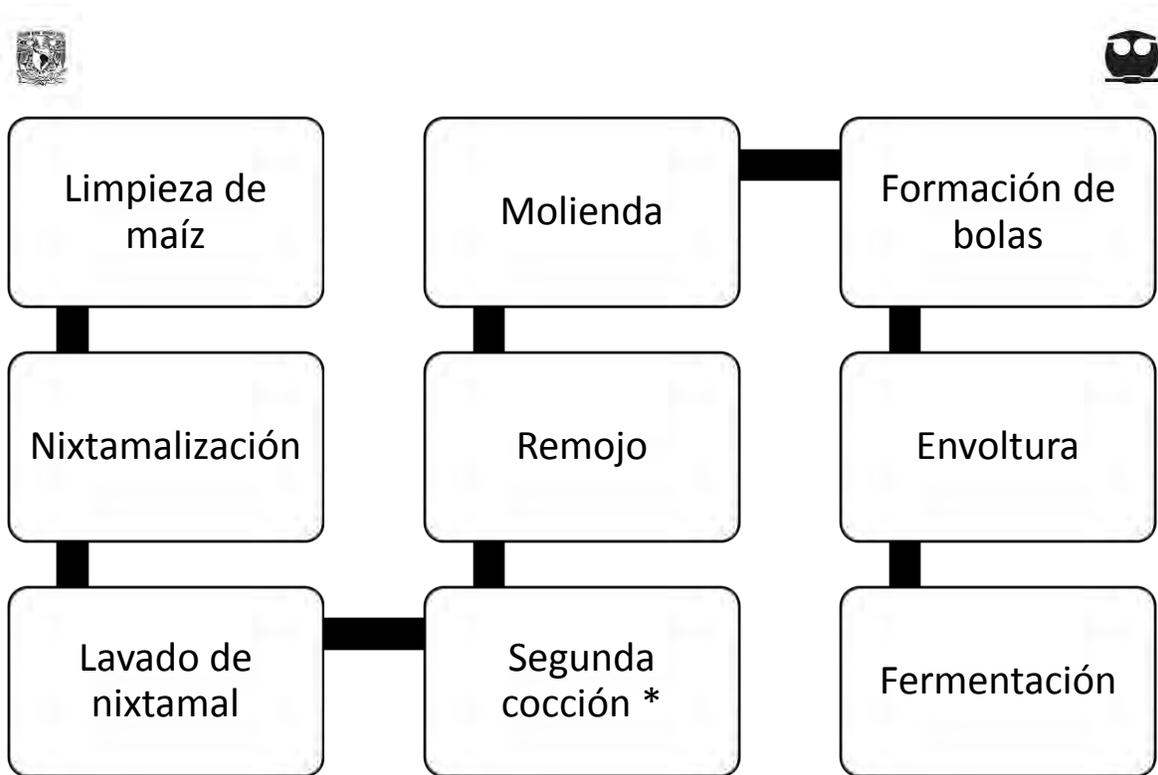


Figura 4.- Diagrama de elaboración del pozol. *Solo se realiza para el pozol mestizo (Cañas et al., 1993; Wachter et al., 1993)

Se presentan dos cambios esenciales en la masa de maíz nixtamalizado durante la fermentación del pozol: el desarrollo del sabor ácido y un aroma característico que da al pozol sus propiedades refrescantes cuando se consume. El contenido de humedad permanece cercano al 30% (Steinkraus, 1995). Wachter et al. (2000), encontraron diferencias en la apariencia física de las bolas de pozol dependiendo del proceso de elaboración. En el pozol mestizo era más suave y húmeda en comparación con el producto indígena, que tiene un aspecto más seco y con partículas duras. La cocción adicional que se aplica en el proceso mestizo tiene un efecto principal sobre las propiedades físicas de la masa, y se presenta un efecto mínimo en la microbiología de la fermentación.

Otra característica importante es el incremento en el contenido nutritivo. El pozol contiene valores más altos en la concentración de proteína (donde las especies fijadoras de nitrógeno pueden ser las responsables del



incremento en el nitrógeno total presente en el producto fermentado), niacina, riboflavina, lisina, triptófano en comparación con el maíz del cual se elabora, aunque el maíz contiene mayor concentración de tiamina y fósforo. Además se encontró una mejor calidad proteica en el pozol, medida por la composición de aminoácidos esenciales y la eficiencia proteica en el desarrollo de ratas albinas, además de haberse encontrado un mayor contenido de nitrógeno total en el alimento fermentado (Steinkraus, 1995).

Microbiología del pozol

La microbiología de esta bebida es bastante amplia y se ha demostrado que en ella se encuentran hongos, levaduras y bacterias de diferentes tipos (Wacher et al., 2000), principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) (Escalante et al., 2001) siendo estas las primeras en crecer y por tanto responsables de la acidificación de la masa, además permanecen en todo el proceso de elaboración. El maíz está compuesto principalmente por almidón como fuente de carbono, mientras que los azúcares libres (sacarosa principalmente) se encuentran en una baja concentración (2g/100g de grano entero), lo que implica que se requiere de la presencia de bacterias ácido lácticas amilolíticas en el pozol, que permitan la degradación del almidón, así como la fermentación láctica del mismo. En trabajos previos se han encontrado bacterias lácticas amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz et al., 2003), pero también bacterias ácido lácticas no amilolíticas: *Weissella confusa*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*, entre otras (Ben Omar et al., 2000). Se ha reportado que el 40% de las bacterias ácido lácticas presente en la masa inicial son amilolíticas, siendo predominantes las bacterias del género *Streptococcus* (Díaz-Ruiz et al., 2003). *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y



Bacillus mycoides son bacterias no lácticas amilolíticas que también se han reportado (Rivera, 2001).

La carga microbiana del pozol va cambiando a lo largo de su elaboración, se ha visto que después del proceso de nixtamalización, la concentración de microorganismos presentes es de menos de 1×10^1 UFC/mL para el caso de enterobacterias y bacterias ácido lácticas, mientras que para los mesófilos aerobios, los mohos y levaduras, es de menos de 1×10^2 UFC/ml. Sin embargo tras el remojo, la cuenta de bacterias ácido lácticas y de mesófilos aerobios aumenta, siendo dicho aumento mayor tras la molienda. Al finalizar el proceso, la cuenta microbiana de bacterias ácido lácticas es de aproximadamente 2×10^9 UFC/mL (Wacher et al., 1993; Nuraida et al., 1995).

Se ha logrado establecer que la molienda del grano de maíz nixtamalizado es la operación clave para que el pozol adquiera el inóculo que lo llevará a tener una microbiota compleja al final del proceso. La cantidad de masa que se va acumulando tras cada lote en el molino es la responsable de dicho inóculo, ya que, además de que la masa permanece ahí todo un día, los microorganismos se mantienen ahí los días subsecuentes, por tanto existe una fuente de microorganismos para los nuevos granos de maíz nixtamalizados que entran para ser molidos (Wacher, et al., 1993).

Probióticos

Los probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud del huésped" (FAO / OMS, 2002). Pueden encontrarse en algunos productos alimenticios o suplementos, su consumo contribuye al



mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias dentro del tracto gastrointestinal.

Se requiere que los microorganismos probióticos se encuentren viables, con un mínimo de 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/g o mL de producto (Forssten et al., 2011).

Los tipos más comunes de bacterias probióticas son las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que a veces se combinan con *Streptococcus thermophilus* (Howlett, 2008). Los probióticos suelen encontrarse habitualmente en productos lácteos fermentados. También se han comercializado como suplementos comercializados en forma de pastillas, cápsulas, bolsitas o sobres. Los probióticos de origen vegetal no han sido muy estudiados.

Los posibles efectos beneficiosos para la salud humana de los probióticos incluyen, entre otras:

- La reducción de la incidencia o gravedad de las infecciones gastrointestinales
- La mejora de las defensas del organismo
- La mejora de las funciones intestinales

Las bacterias probióticas ejercen su influencia beneficiosa de varias maneras. Produciendo sustancias antimicrobianas, compitiendo con las bacterias patógenas por los nutrientes o por los puntos de unión en la pared intestinal, y modulando el sistema inmunitario del huésped, entre otras. Sea cual sea el mecanismo, para que los efectos favorables se aprecien y se prolonguen es necesario consumir bacterias probióticas de manera regular, ya que su colonización en el intestino es temporal. Es



importante mencionar que la capacidad probiótica es una propiedad a nivel de especie o más allá de la especie. Por ejemplo, no todas las cepas de *Lactobacillus plantarum* son probióticas.

En trabajos previos donde se realizaron pruebas de tolerancia a la acidez y a las sales biliares, resistencia al fenol y a ciertos antibióticos, producción de peróxido de hidrógeno, resistencia al paso sucesivo a través del tracto intestinal (usando un modelo) y adherencia a las células HEP2; se ha demostrado que cepas aisladas del pozol *Streptococcus* (11 y 49) tienen un mayor potencial probiótico, seguidas de las cepas 6 (*Weissella paramenterioides*) y 73 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) (Rodríguez y Villalva, 2010).

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* (Sii)

El género *Streptococcus* comprende cocos o cocos ovoides, Gram positivos, agrupados en pares o cadenas, catalasa negativos. Son nutricionalmente exigentes y requieren medios de cultivo complejos, complementados preferiblemente con sangre, para un crecimiento óptimo, en el caso de los patógenos. Son bacterias ácido lácticas homofermentativas, producen ácido láctico sin gas como el principal producto final del metabolismo de la glucosa. Son anaerobios facultativos, crecen en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Ruoff y Bisno).

Sii es una bacteria comúnmente asociada con el trato gastrointestinal de los animales y los seres humanos (Herrera, 2009). Además, se ha aislado a partir de productos lácteos, las heces fecales de mamíferos, sangre humana y pacientes con endocarditis (Jans et al., 2012; Wullschleger et al., 2013). Se ha encontrado en los alimentos de leche de camella fermentada espontáneamente, como el garris de Sudán, suusac en Kenia



y Somalia. También en otros alimentos fermentados de África (Jans et al., 2012).

Streptococcus bovis, que posteriormente fue identificado como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Sii-25124), se ha aislado del pozol, siendo esta última de las bacterias predominantes durante todo el proceso de fermentación. Se ha visto, además, que es importante durante la primera etapa de fermentación en la que es necesaria la hidrólisis de almidón para dar paso a azúcares más sencillos (Díaz-Ruiz et al., 2003).

Estudios microbiológicos indican que el pozol contiene una gran cantidad de bacterias lácticas, que son las primeras en desarrollarse y que están presentes durante todo el proceso de elaboración de esta bebida. De ellas destacan las bacterias amilolíticas como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Díaz et al., 2003). Estas bacterias convierten el almidón del nixtamal (su principal carbohidrato), primero en glucosa y maltosa y posteriormente en ácidos (Wacher, 2014).

El pozol al inicio de la fermentación tiene una cuenta de 10^5 UFC/g de bacterias lácticas amilolíticas (Díaz et al., 1999).



Justificación

Existen alrededor del mundo una variedad de alimentos fermentados que se han preparado y consumido por cientos de años y están fuertemente asociados a culturas y tradiciones; México cuenta con una amplia variedad de alimentos y bebidas, entre ellos, el pozol y el atole agrio.

Los alimentos fermentados han sido objeto de estudio debido a sus efectos en la salud, prevención de enfermedades o efectos curativos; la ecología microbiana del pozol ha sido ampliamente estudiada, se han aislado bacterias lácticas con potencial probiótico o antimicrobiano; sin embargo la del atole agrio no ha sido muy estudiada.

Las características microbiológicas y bioquímicas del atole agrio son seguramente diferentes que las del pozol, ya que ambos se elaboran a partir de maíz, pero en el del pozol se nixtamaliza y en el atole agrio no se nixtamaliza.

Los cultivos iniciadores se utilizan para incrementar la velocidad de los procesos de fermentación, reducir la variabilidad en la calidad, limitar el crecimiento de bacterias de descomposición y patógenas, y mejorar las cualidades sensoriales del producto (Talón y S. Leroy, 2014). El desarrollo y la mejora de estos han sido las fuerzas impulsoras para la transformación de los procesos tradicionales de fermentación de alimentos en los países en desarrollo de un "arte" a una ciencia.

El atole agrio es ampliamente consumido, por lo que es importante producirlo en condiciones más controladas, por lo cual se propone realizar una fermentación láctica dirigida de este alimento como un primer intento



de obtener un producto con las características fisicoquímicas y microbiológicas similares a las del producto elaborado en los lugares de consumo.



Hipótesis

Ya que los cultivos iniciadores predominan cuando se inoculan en un sustrato, al inocular masa y masa de nixtamal con bacterias lácticas, se obtendrán cuentas microbianas similares a las del atole agrio y del pozol respectivamente.

Al inocular la masa de nixtamal con *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Sii-25124) se obtendrá un crecimiento y propiedades fisicoquímicas similares a las del pozol.

La concentración de azúcares totales disminuirá con mayor rapidez en una fermentación dirigida que en la masa no inoculada.

La concentración de azúcares reductores será mayor en la masa donde se inocule *Sii-25124*, que en la no inoculada.



Objetivo general

Realizar fermentaciones de masa de maíz y de nixtamal inoculadas con bacterias lácticas, como un primer intento para obtener un producto con características microbiológicas y fisicoquímicas similares a las del producto tradicional.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar los cambios microbiológicos y fisicoquímicos en el maíz no nixtamalizado por la acción de bacterias lácticas *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*.
- 2.- Seguir la actividad de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* en la fermentación de masa de nixtamal mediante pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, compararla con la actividad que tienen las bacterias lácticas en el pozol.
- 3.- Comparar el comportamiento de las bacterias lácticas en la fermentación con masa de nixtamal y la fermentación con maíz no nixtamalizado.



Metodología

En las Figuras 5 y 6 se muestran las estrategias experimentales llevadas a cabo durante el estudio de las fermentaciones dirigidas con bacterias lácticas en masa de maíz sin nixtamalizar y nixtamalizado.

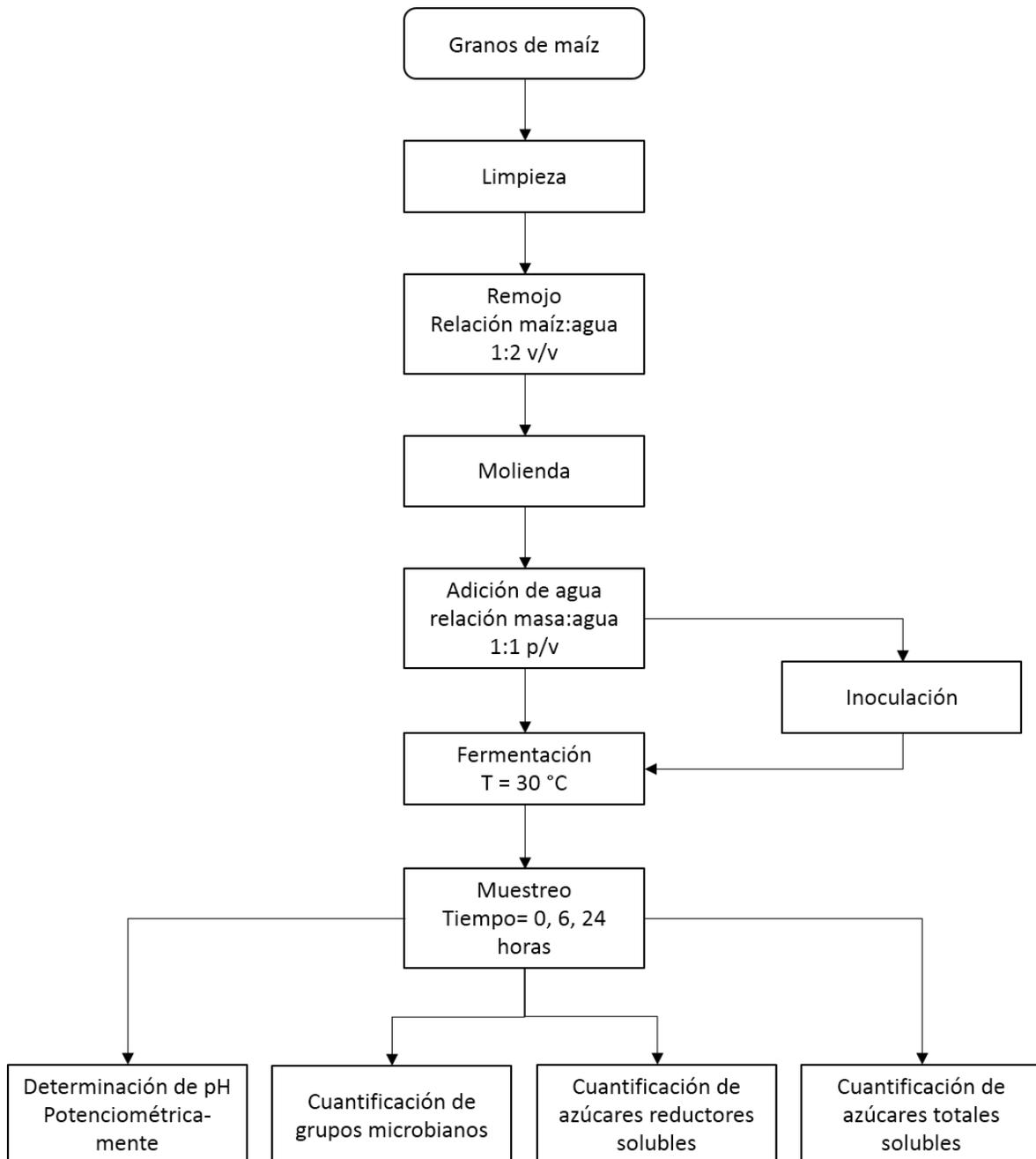


Figura 5.- Metodología general llevada a cabo para el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz sin nixtamalizar

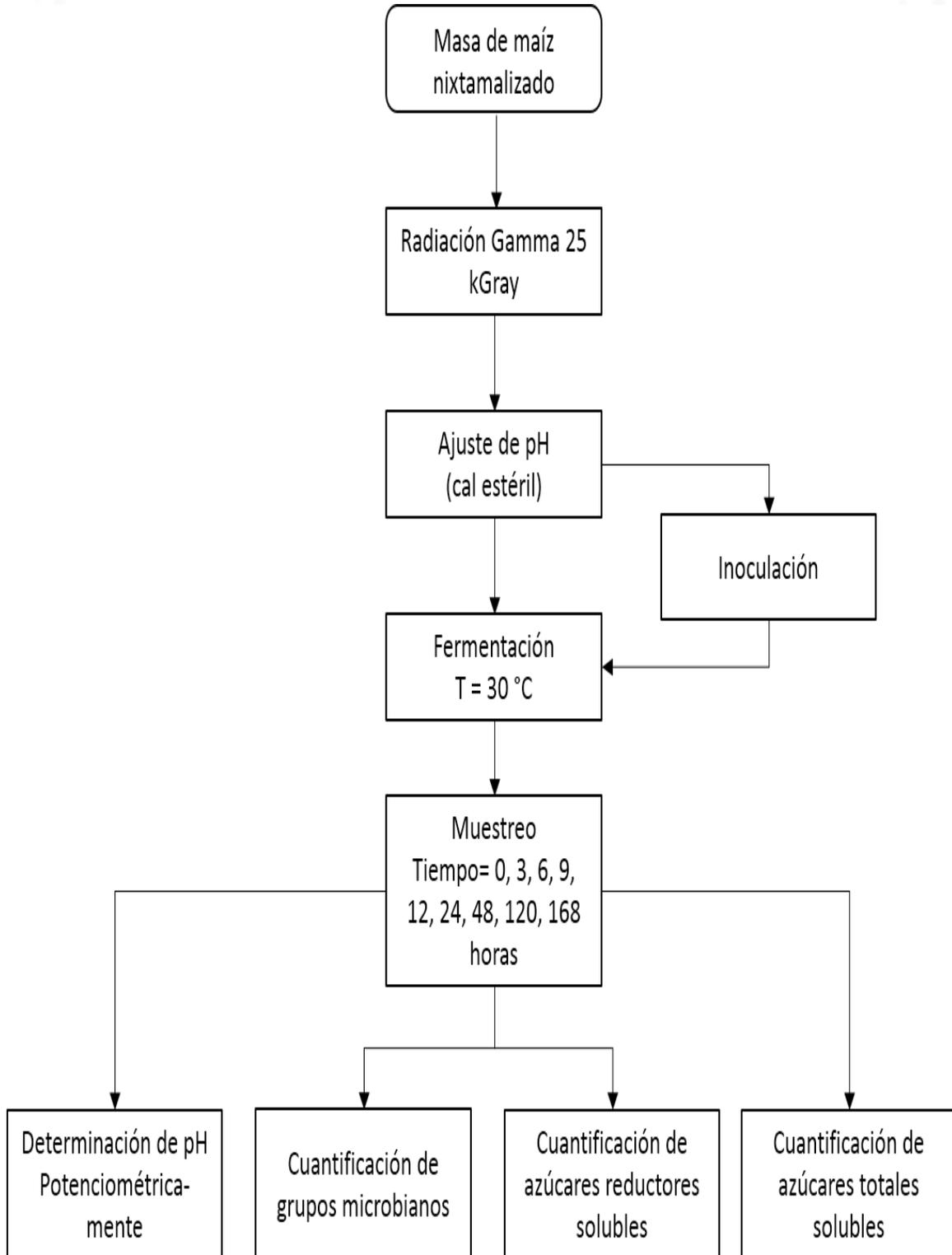


Figura 6.- Metodología general llevada a cabo para el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz nixtamalizado



Metodología empleada en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas usando masa de maíz sin nixtamalizar (atole agrio).

Maíz usado y su tratamiento.

No se usó maíz de dobla, ya que es estacional y el año en que se realizó esta tesis no fue posible conseguirlo debido a que la producción no fue buena. Se ocupó maíz traído de la localidad de Tehuacán, Puebla, era un maíz blanco con el pedículo de color morado (Figura 7), este maíz era seco por lo que fue necesario remojarlo (antes de molerlo) en agua destilada (relación maíz-agua 1:2 v/v) durante aproximadamente 20 horas, posteriormente se molió dos veces con ayuda de un molino manual. Finalmente se hicieron lotes de 200 g de cada uno y almacenaron en ultracongelación a -70°C .



Figura 7.- Maíz de Tehuacán, Puebla

Tratamiento de la muestra.

Se preparó atole agrio hasta la etapa de fermentación, antes del calentamiento, para obtener el atole, ya que se pretende estudiar su microbiota. Se usó una relación maíz: agua de 1:2, la masa fue disgregada en agua destilada estéril. Se usaron las cepas A1MS3 y Sol10 como



cultivos iniciadores, añadiendo el 1% (v/v) de cultivo iniciador e incubando a 30 °C. En los tiempos 0, 6 y 24 horas se tomaron muestras para cuantificar los diferentes grupos microbianos. Además, se determinaron el pH, el porcentaje de acidez así como la concentración de azúcares reductores y totales.

Cultivo iniciador.

Las cepas del atole agrio utilizadas en el presente trabajo fueron aisladas e identificadas por Vâkevâinen (comunicación personal). Se preparó el cultivo iniciador para las fermentaciones dirigidas realizadas, con la cepa A1MS3, *Lactococcus lactis*, que es un coco ovoide, Gram positivo, inmóvil, catalasa negativa, oxidasa negativa, no formadora de esporas, anaerobia facultativa. Y la segunda es la cepa Sol10 la cual pertenece a la especie *Pediococcus pentosaceus*. Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, no móvil, no esporulado.

Preparación de inóculo.

Se tomaron 50 μL de la cepa, la cual se encontraba almacenada en medio MRS-20% Glicerol en ultracongelación (-70 °C), se colocaron en 5 mL de caldo MRS y se incubaron a 30°C durante 24h (primer pase). Se tomaron 50 μL del cultivo del primer pase, se colocaron en 5 mL de caldo MRS, se incubó 20h (segundo pase).

Fermentación.

Se preparó atole agrio usando la relación masa: agua destilada estéril (1:2 masa: agua), se usaron las cepas A1MS3 y Sol10 del segundo pase como cultivos iniciadores añadiendo el 1% (v/v) e incubando a 30°C. En el caso de la fermentación control, se realizó el mismo procedimiento pero no se inoculó. Se realizó duplicado de la fermentación dirigida y de la fermentación natural.



Pruebas microbiológicas.

Se realizaron análisis de cuenta en placa para determinar mesófilos aerobios, bacterias lácticas, coliformes totales, mohos y levaduras; usando agar cuenta en placa (PCA), agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta (BRVA) y agar papa dextrosa (PDA) respectivamente; a diferentes tiempos de fermentación: 0, 6 y 24 horas.

Para ello se tomaron 10 mL de muestra en una bolsa estéril para Stomacher y se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1 %, se homogenizó en el Stomacher 400 (Seward) y se llevaron a cabo las diluciones seriadas correspondientes, para esto fue necesario tomar 0.5 mL de la muestra y se colocaron en un vial con 4.5 mL de agua peptonada estéril al 0.1 %; después se tomó 0.1 mL de cada dilución y se inocularon en las placas correspondientes (por duplicado). El inóculo se esparció con ayuda de una asa triangular de vidrio previamente flameada, por el método de extensión superficial. Finalmente se incubó cada placa de la manera indicada en la tabla 4.

Al cabo de 24 se realizó el conteo de cada placa de acuerdo con las características de cada medio de cultivo y con la sensibilidad para cada grupo microbiano (Tabla 4).

Tabla 4.- Medios y condiciones de cultivo utilizados para la cuantificación de los distintos grupos microbianos, características de las colonias contadas y el intervalo de cuenta usado para tener cuentas significativas.

Medio de cultivo	Grupo microbiano a cuantificar	Condiciones de incubación	Características de las colonias	Intervalo de sensibilidad de colonias por placa
PCA	Mesófilos aerobios no lácticos	30 °C / 24 horas	Colonias grandes, mayores de 2 mm	25 - 250
MRS	Bacterias lácticas	30 °C / 24 horas	Colonias generalmente pequeñas 2mm o menos, color crema, lisas	25 - 250



MASSW	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> clave 11	30 °C / 24 horas	Colonias amarillas con halo de hidrólisis de almidón	Todas las presentes
BRVGA	Enterobacterias	37 °C / 24 horas	Fermentadoras de glucosa: Color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado	15 - 150
PDA	Hongos y levaduras	30 °C / 24 horas	Levaduras: colonias mayores de 2mm. Hongos: Colonias difusas y de varios colores.	15 - 150
BRVA	Coliformes totales	37 °C / 24 horas	Fermentadoras de lactosa: Color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado	15 - 150

Determinación de pH.

Se usó el potenciómetro (Oakton, pH 700). Previo a las mediciones el potenciómetro se calibró con un amortiguador de pH 7 (solución de fosfatos de sodio y potasio) y un amortiguador de pH 4 (solución de ftalato ácido de potasio). Se tomaron 5 mL de la muestra para hacer la medición.

Determinación de acidez total titulable.

Se tomaron 10 mL de muestra, se mezclaron con 100 mL de agua destilada y se valoró con NaOH 0.25 M; usando fenolftaleína como indicador (Nwokoro, 2012).

Se registró el volumen de NaOH gastado (V). Se asume que todo el ácido producido es ácido láctico y se emplea la ecuación.

$$\% \text{ ATT} = \frac{(V)(n)(0.09)}{\text{Volumen de la muestra}} \times 100$$



Donde ATT (%) es la acidez total titulable, N es la Normalidad de la solución de NaOH y 0.09 son los miliequivalentes de ácido láctico.

Determinación de carbohidratos reductores.

Método ácido dinitrosalicílico (DNS) (James, 1999)

Se realizaron diluciones de la muestra y se dejó reposar por 10 minutos aproximadamente para que sedimentara; se tomó 1 mL de la solución acuosa de la muestra, se adicionaron 1.5 mL del reactivo de DNS y se calentaron por 5 minutos en un baño de agua hirviente. Los tubos se dejaron enfriar en baño de hielo (aproximadamente 5 minutos) y se agregaron 5 mL de agua destilada. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y de agua destilada, tratados de igual que la muestra.

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar (Apéndice 1) preparada con el carbohidrato reductor de interés y en este caso se usó glucosa.

Determinación de carbohidratos totales.

Método de fenol-sulfúrico (F-S) (Dubois, et al., 1956)

Se realizaron diluciones de la muestra y se dejaron reposar por 10 minutos aproximadamente; se tomó 1 mL de la solución acuosa de la muestra, se añadieron 0.5 mL de una solución acuosa de fenol al 5%, se añadieron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se homogenizó. La mezcla se enfrió en baño de hielo (aproximadamente 10-15 minutos) y se determinó la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua destilada.



Se calculó la concentración de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva estándar (Apéndice 2) preparada con glucosa.

Metodología empleada en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas usando masa de maíz nixtamalizado (pozol).

Tratamiento de la muestra.

La masa de nixtamal (masa recién molida) fue recolectada en el mercado Pino Suárez de Villahermosa, Tabasco. Se colocó en bolsas de plástico y fue enviada por avión a la Cd. de México en una hielera. Se recibió aproximadamente 6 h después de haberse tomado la muestra.

Una vez recibida la masa en el laboratorio 324 (Conjunto E, Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM), se homogenizó usando una tina de plástico sanitizada con alcohol, en ella se vació la masa contenida en las bolsas, las cuales previamente se limpiaron con alcohol. Se amasó manualmente usando guantes de látex, se dividió en lotes de 700g aproximadamente que fueron colocados en bolsas estériles Stomacher, se procedió a sellar por calor; todo lo anterior fue realizado en una campana de flujo laminar. Estas fueron almacenadas en refrigeración y al día siguiente fueron enviadas a esterilizar por radiación Gamma (25 kGray, fuente Co^{60}) al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Una vez esterilizada la muestra fue nuevamente almacenada en refrigeración para ser utilizada al día siguiente.

Cultivo iniciador.

La cepa usada para la inoculación pertenece a la colección de cepas aisladas de pozol del laboratorio 324, correspondiente a ***Streptococcus infantarius subsp. infantarius 25124***. Esta cepa presenta potencial probiótico (Rodríguez y Villalba, 2010).



Preparación del inóculo.

Se tomaron 50 μL de la cepa, la cual se encontraba almacenada en medio MRS-20% Glicerol en ultracongelación ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), se colocaron en 5 mL de caldo MRS y se incubaron a 30°C durante 24 h (primer pase). Se tomaron 50 μL del cultivo del primer pase, se colocaron en 5 mL de caldo MRS, se incubó 18 h (segundo pase).

Ajuste de pH de masa de nixtamal.

La masa de nixtamal irradiada fue homogenizada usando una tina de plástico sanitizada con alcohol, en ella se vaciaron las bolsas de masa que previamente se limpiaron con alcohol, se amasó manualmente usando guantes de látex; todo lo anterior fue realizado en una campana de flujo laminar. Y antes de inocular para iniciar la fermentación se adicionó una solución de cal estéril para ajustar el pH de la masa en 6.5.

Fermentación.

Se agregó la cantidad necesaria de inóculo del segundo pase recién elaborado en MRS y diluido en agua peptonada 0.1% para obtener una concentración inicial de aproximadamente 10^6 UFC/g. Se homogenizó manualmente usando guantes de látex y se dividió en lotes de 100 g que fueron colocados en frascos de vidrio con tapas de aluminio previamente esterilizados. Para el control se agregó la misma cantidad de agua destilada estéril y se dividió en lotes de 100 g que fueron colocados en frascos de vidrio con tapas de aluminio previamente esterilizados y se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó un triplicado tanto para la muestra inoculada como para el control, es decir se retiraron 3 frascos para analizarlos individualmente en cada tiempo de muestreo.

Análisis microbiológicos.

Se realizaron análisis de cuenta en placa para determinar mesófilos aerobios no lácticos, bacterias lácticas, enterobacterias y *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124, usando agar cuenta en placa (PCA),



agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta con glucosa (BRVGA) y agar MASSW respectivamente; a diferentes tiempos de fermentación 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 120 y 168 horas.

Para ello se tomaron 10 g de muestra en una bolsa Stomacher y se agregaron 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1 %. Se homogenizó en el equipo Stomacher 400 Seward y se llevaron a cabo las diluciones seriadas correspondientes, para esto fue necesario tomar 0.5 mL de la muestra y se colocaron en un vial con 4.5 mL de agua peptonada estéril al 0.1 %; después se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se inocularon en las placas correspondientes (por duplicado). El inóculo se esparció con ayuda de una asa triangular de vidrio, previamente flameada, por el método de extensión superficial. Finalmente se incubó cada placa de la manera indicada en la tabla 4.

Después de 24 horas de incubación se llevó a cabo el conteo de cada una de las placas de acuerdo con las características de cada medio de cultivo y la sensibilidad para cada grupo microbiano (tabla 4). En el caso de mohos y levaduras las cuentas se llevaron a cabo a los 3 días.

Determinación de pH.

Se tomaron 5 gramos de la muestra y se diluyeron con 25 mL de agua destilada para hacer la medición, se usó el potenciómetro Oakton pH 700, previo a las mediciones el potenciómetro se calibró con un amortiguador de pH 7 (solución de fosfatos de sodio y potasio) y un amortiguador de pH 4 (solución de ftalato ácido de potasio).

Determinación de acidez total titulable.

Se tomaron 5 gramos de la muestra, se diluyo con 25 mL de agua destilada y se valoró con NaOH 0.1 M; usando fenolftaleína como indicador (Nwokoro, 2012). Se registró el volumen de NaOH gastado (V)



se asume que todo el ácido producido es ácido láctico y se emplea la ecuación siguiente. Donde ATT (%) es la acidez total titulable, N es la Normalidad de la solución de NaOH y 0.09 son los miliequivalentes de ácido láctico.

$$\% ATT = \frac{(V)(n)(0.09)}{\text{Volumen de la muestra}} \times 100$$

Determinación de carbohidratos reductores.

Método ácido dinitrosalicílico (DNS) (James, 1999). La metodología es la misma descrita para el estudio de la fermentación de maíz sin nixtamalizar.

Determinación de carbohidratos totales.

Método de fenol-sulfúrico (F-S) (Dubois, et al., 1956). La metodología es la misma descrita para el estudio de la fermentación de maíz sin nixtamalizar.



Resultados y discusión.

- *Fermentaciones en masa de maíz sin nixtamalizar (Atole agrio)*

Fermentación natural en masa de maíz sin nixtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla

En este ensayo se controló la temperatura de la fermentación en 30°C y no se inoculó.

La concentración inicial de bacterias lácticas fue de $< 10^1$ UFC/mL mientras que en la literatura (Valderrama, 2012) se encuentra que es de 91×10^4 UFC/mL en la fermentación natural de atole agrio que se realizó en Villahermosa, Tabasco; a las 6 horas se obtuvo una cuenta de bacterias lácticas de 9.1×10^5 UFC/mL y lo reportado es de $> 10^5$ UFC/mL (Valderrama, 2012), a las 24 horas se encontró una cuenta de 1.4×10^9 UFC/mL. Estas diferencias son debidas seguramente a que la microbiota de maíz de Villahermosa, Tabasco es diferente a la del maíz de Tehuacán, Puebla. En cuanto al pH, se reporta que es de 6.5 al inicio de la fermentación y lo que se obtuvo fue un promedio de 6.25 y que este va disminuyendo conforme avanza la fermentación (Tabla 5).

La cuenta de mesófilos aerobios fue aumentando conforme pasaba el tiempo. Inicialmente se encontraron 4.2×10^4 UFC/mL y las 24 horas 1.7×10^9 UFC/mL; de igual manera la cuenta de enterobacterias se incrementó, contrario de lo que se reporta en la literatura, ya que disminuyen a medida que disminuye el pH (Esquivel, 2012); no se detectaron mohos en las diluciones utilizadas (Apéndice 3).



Tabla 5.- Concentración de microorganismos durante la fermentación natural (UFC/mL), valores de pH y acidez. Usando maíz de Tehuacán, Puebla.

Tiempo (horas)	0	6	24
Bacterias lácticas (UFC/mL)	$<10^1$	9.1×10^5	1.4×10^9
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	4.2×10^4	2.1×10^6	1.7×10^9
Levaduras (UFC/mL)	$<10^3$	$<10^3$	2.57×10^9
Mohos (UFC/mL)	$<10^3$	$<10^5$	$<10^5$
Enterobacterias (UFC/mL)	6.2×10^4	4.3×10^6	2.7×10^7
pH	6.25	6.07	3.35
% Acidez titulable	0.07	0.13	0.65

Fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz sin ninxtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla.

Una vez que se conoció la población de bacterias lácticas al inicio de la fermentación natural, se procedió a realizar la fermentación dirigida usando las cepas A1MS3 y la Sol 10 (*Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*, respectivamente), en esta ocasión se presentan promedios de tres ensayos realizados y los conteos de grupos bacterianos se hicieron por duplicado en cada ensayo, las determinaciones de pH y acidez total titulable por triplicado (Tabla 6).

Tabla 6.- Concentración de microorganismos durante la fermentación dirigida (Cultivo iniciador A1MS3 y la Sol 10) del atole agrio (UFC/mL), valores de pH y acidez. Usando maíz de Tehuacán, Puebla.

Tiempo (horas)	0	6	24
Bacterias lácticas (UFC/mL)	6.1×10^7	1.7×10^{10}	1.4×10^{10}
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	2.0×10^7	4.39×10^9	4.2×10^9
Levaduras (UFC/mL)	7.4×10^7	1.4×10^{10}	5.6×10^9
Mohos (UFC/mL)	$<10^4$	$<10^6$	$<10^7$
Enterobacterias	5.7×10^4	7.2×10^5	$<10^1$



(UFC/mL)			
pH	5.97	4.73	3.71
% Acidez titulable	0.09	0.32	0.93

Las bacterias lácticas fueron aumentando en el transcurso de la fermentación, del tiempo cero al tiempo seis aumentaron tres ciclos logarítmicos 6.1×10^7 UFC/mL a 1.7×10^{10} UFC/mL; mientras que en la literatura se señala (Valderrama, 2012) que de las cero horas a las seis se aumenta un ciclo logarítmico 91×10^4 UFC/mL a $>10^5$ UFC/mL, esto quiere decir que el haber inoculado la masa fue de gran ayuda para acelerar la fermentación.

La cuenta de enterobacterias aumentó a las 6 horas de fermentación, pero al cabo de 24 horas ya no fueron encontradas en las diluciones empleadas (Apéndice 3); lo contrario de lo sucedido en la fermentación control, donde a las 24 horas aún prevalecían. Esto puede deberse a que los microorganismos inoculados ayudaron al control de las enterobacterias. La cuenta de mesófilos aerobios y de levaduras fue aumentando durante el transcurso de la fermentación.

El pH inicial fue de 5.97 y disminuyó hasta 3.71, la acidez fue aumentando conforme avanzaba la fermentación y conforme disminuía el pH.

En la Figura 8 se puede apreciar que a pesar de que la concentración de bacterias lácticas en la muestra inoculada fue mayor, sigue la misma tendencia de crecimiento que en la muestra sin inocular, así mismo el comportamiento de pH fue similar.

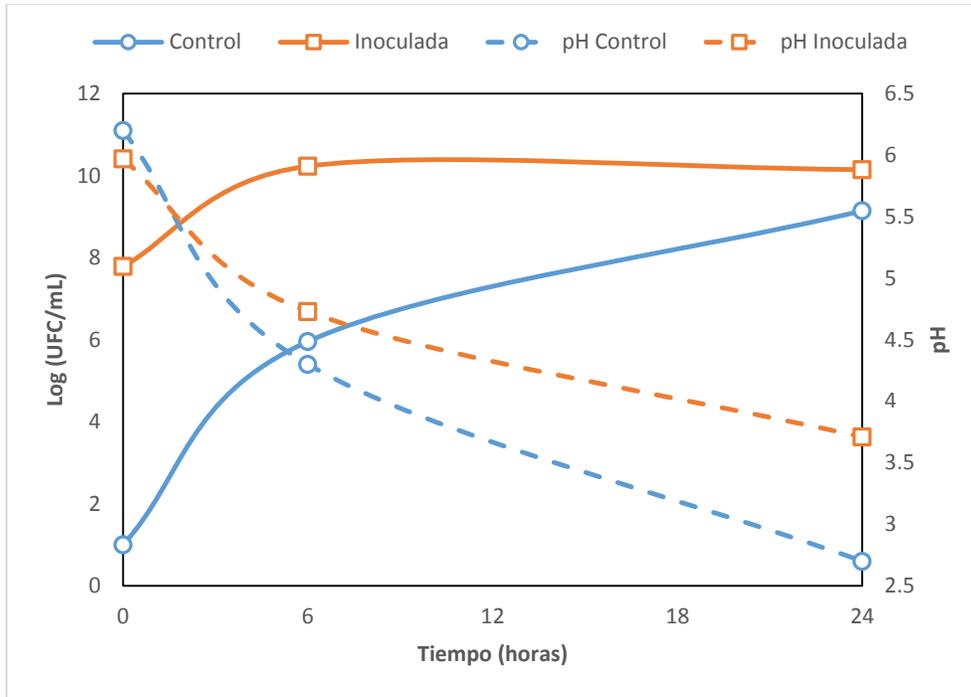


Figura 8.- Concentración de bacterias lácticas y valores de pH en la fermentación natural y dirigida con bacterias lácticas (*Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*) en masa de maíz sin nixtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla.

- *Fermentaciones en masa de maíz nixtamalizado (Pozol)*

Fermentación de masa de nixtamal sin inocular de Villahermosa, Tabasco.

En la masa esterilizada no se detectaron mesófilos aerobios no lácticos ni enterobacterias, aunque se encontró una cuenta de bacterias lácticas (Tabla7) (Apéndice 4).

Tabla 7.- Cuantificación de microorganismos en la muestra control de masa de nixtamal sin inocular e incubada a 30°C

Tiempo	Bacterias lácticas	Mesófilos aerobios no lácticos	Enterobacterias
horas	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
0	<25x10 ²	<25x10 ²	<15x10 ²
3	7.0x10 ⁴	-	-
6	1.0x10 ⁴	<25x10 ²	<15x10 ²
9	1.1x10 ⁴	-	-



12	6.5×10^4	$< 25 \times 10^2$	$< 15 \times 10^2$
24	3.4×10^5	$< 25 \times 10^2$	$< 15 \times 10^2$
48	3.7×10^7	$< 25 \times 10^2$	$< 15 \times 10^2$
120	4.9×10^7	$< 25 \times 10^2$	$< 15 \times 10^2$
168	7.0×10^7	$< 25 \times 10^2$	$< 15 \times 10^2$

-: No se realizó la determinación

La actividad de las bacterias lácticas provocó que el pH fuera disminuyendo de 6.52 al tiempo cero y llegando a 4.50 a las 168 horas de fermentación (Figura 9), también se puede apreciar que de las 48 horas a las 168 horas los cambios fueron menores.

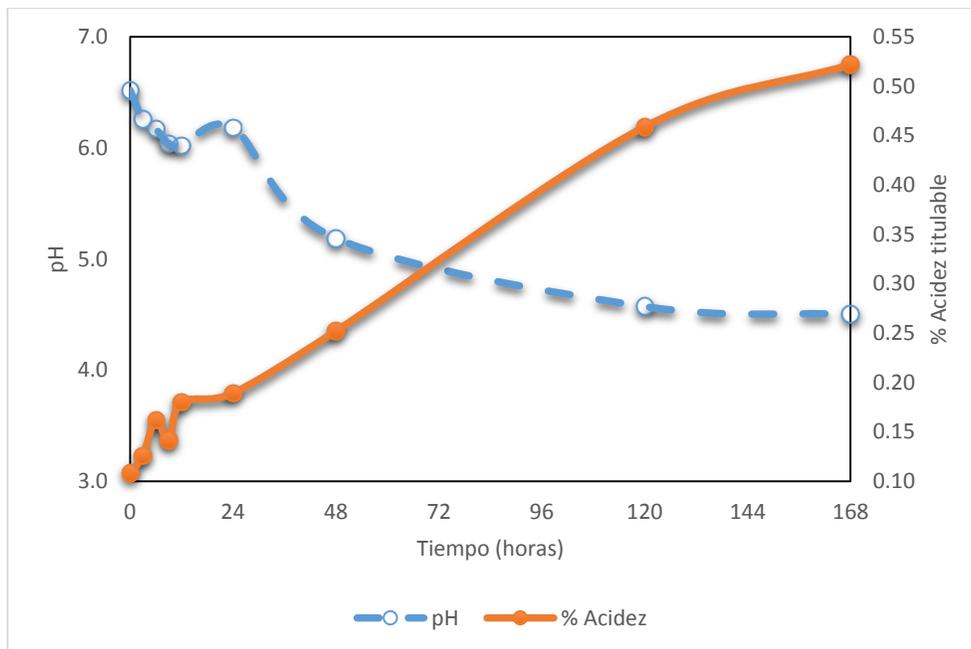


Figura 9.- Valores de pH y % de acidez titulable en muestra control de masa de nixtamal



Fermentación dirigida con *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* 25124 en masa de nixtamal esterilizada.

Se inoculó Sii con una concentración de 10^7 UFC/g y creció hasta alcanzar 10^{10} UFC/g a las 48 horas, manteniéndose así hasta las 168 horas (figura 10). Se ha reportado que la cuenta de bacterias lácticas alcanza 10^9 UFC/g a las 24 horas y se mantiene así hasta las 72 horas (Díaz et al., 1999).

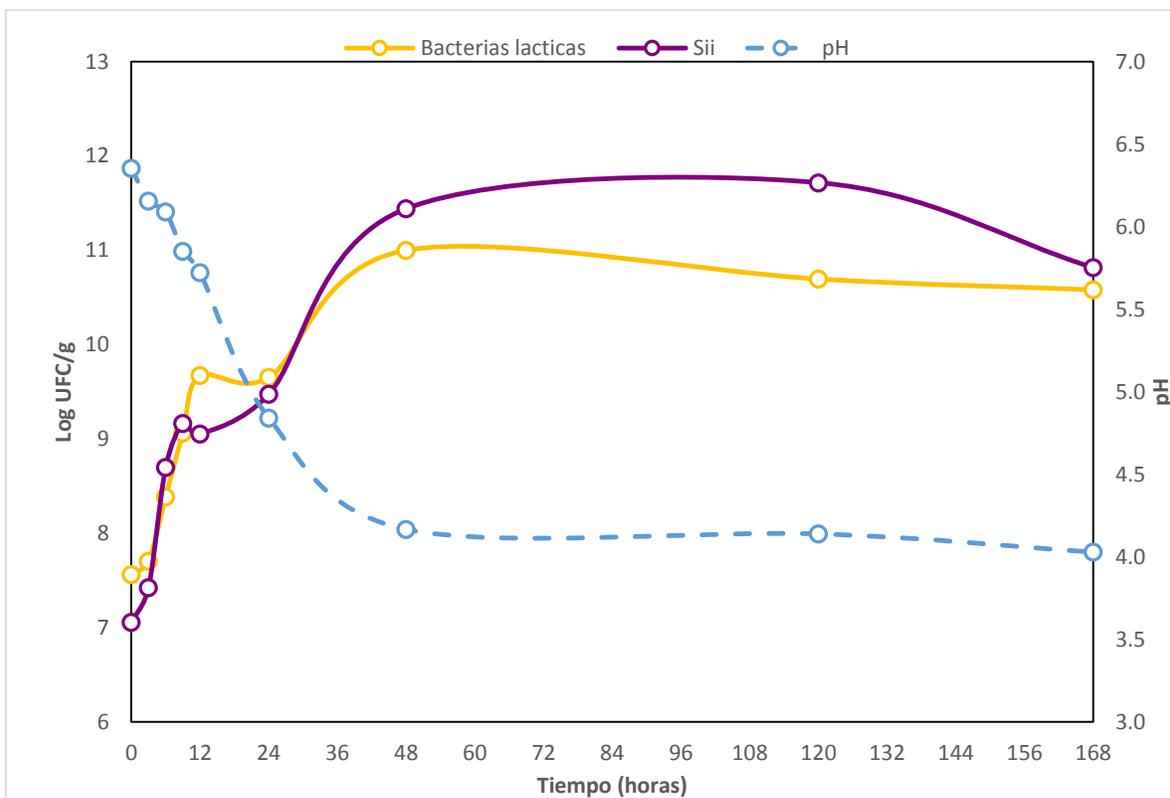


Figura 10.- Concentración de bacterias lácticas, Sii-25124 y valores de pH en la fermentación dirigida en masa de nixtamal Sii-25124 e incubada a 30°C.

Streptococcus infantarius subsp. *infantarius* (Sii-25124) es capaz de crecer en el medio MRS que cuantifica a las bacterias lácticas totales, es por ello que la tendencia de crecimiento con Sii-25124 es similar (Figura 10); esto se realizó para corroborar la única presencia del microorganismo usado en este estudio, sí en el medio MRS se hubiese encontrado un



número superior de colonias, esto indicaría contaminación por otros microorganismos. También se usó medio PCA para cuantificar mesófilos aerobios no lácticos y medio BRVGA para enterobacterias, de los cuales no se detectó presencia (Tabla 8) con las diluciones empleadas (Apéndice 4).

Tabla 8. - Cuantificación de microorganismos en masa de nixtamal inoculada con *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124.

Tiempo horas	Muestra inoculada	
	Mesófilos aerobios no lácticos UFC/mL	Enterobacterias UFC/mL
0	<25x10 ⁴	<15x10 ²
3	-	-
6	<25x10 ⁵	<15x10 ²
9	-	-
12	<25x10 ⁶	<15x10 ²
24	<25x10 ⁶	<15x10 ²
48	<25x10 ⁷	<15x10 ²
120	<25x10 ⁶	<15x10 ²
168	<25x10 ⁷	<15x10 ²

-: No se realizó la determinación

El pH inicial de la fermentación fue de 6.35 y fue disminuyendo progresivamente hasta llegar a 4.03 a las 168 horas, lo cual coincide con la literatura pues se sabe que se alcanza un pH cercano a 4 (Wacher, 2014). Como se puede observar en la Figura 11 el descenso de pH está relacionado con el crecimiento de la bacteria. La concentración de ácido láctico se incrementó desde 0.108 % hasta 0.817 % a las 168 horas (Figura 11).

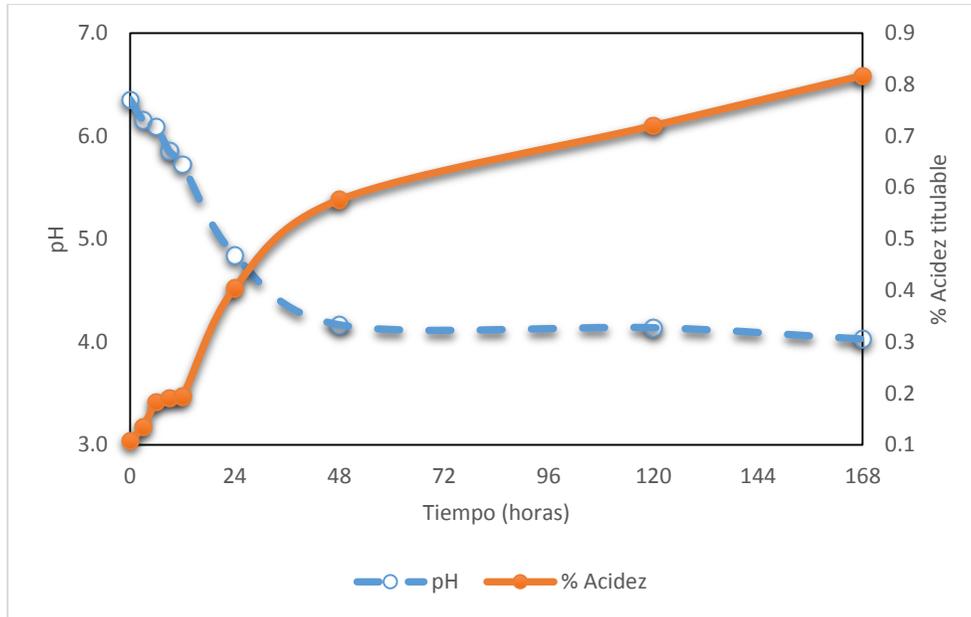


Figura 11.- Valores de pH y % de acidez titulable en fermentación dirigida con Sii en masa de nixtamal

Fermentación con Lactococcus lactis y Pediococcus pentosaceus en masa de maíz sin nixtamalizar vs. Fermentación dirigida con Sii-25124 en masa de nixtamal estéril inoculada

Muestras control.

La muestra de masa de Tehuacán, Puebla, al no ser esterilizada contaba con una gran variedad de bacterias lácticas que fueron creciendo a lo largo de la fermentación. De las cero a las seis horas se observó un aumento de cinco ciclos logarítmicos, mientras que en la muestra de masa de nixtamal estéril de Villahermosa, Tabasco, se apreció el aumento de un ciclo logarítmico. Al cabo de 24 horas la muestra de Tehuacán, Puebla alcanzó una concentración de 10^9 y la de Villahermosa, Tabasco de 10^5 (Figura 12).

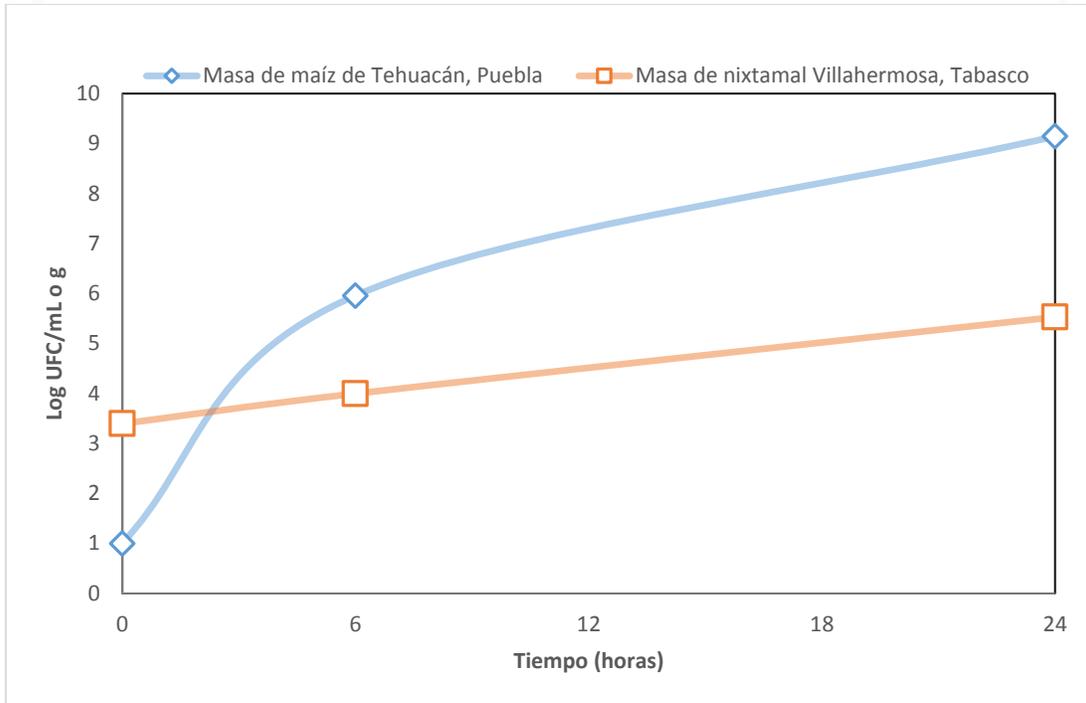


Figura 12.- Crecimiento de bacterias lácticas en muestras control masa de maíz de Tehuacán, Puebla y masa de nixtamal estéril de Villahermosa, Tabasco.

Se ha reportado que las bacterias lácticas son las predominantes en la fermentación del atole agrio y del pozol; durante la fermentación dirigida de la masa de maíz sin nixtamalizar y nixtamalizada se cuantificó el crecimiento de bacterias lácticas. En el primer caso la cuenta englobó a las bacterias propias del alimento y las del cultivo mixto y en el segundo solo se cuantificó la bacteria láctica inoculada (*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 25124). Al inicio de la fermentación de la masa sin nixtamalizar se alcanzó una concentración de 10^8 UFC/mL de bacterias lácticas y las 6 horas la concentración aumentó dos ciclos logarítmicos, permaneciendo así hasta las 24 horas. En el caso de la fermentación de masa de nixtamal se inició con 10^7 UFC/mL y de igual manera a las 6 horas se observó un aumento de dos ciclos logarítmicos (Figura 13).

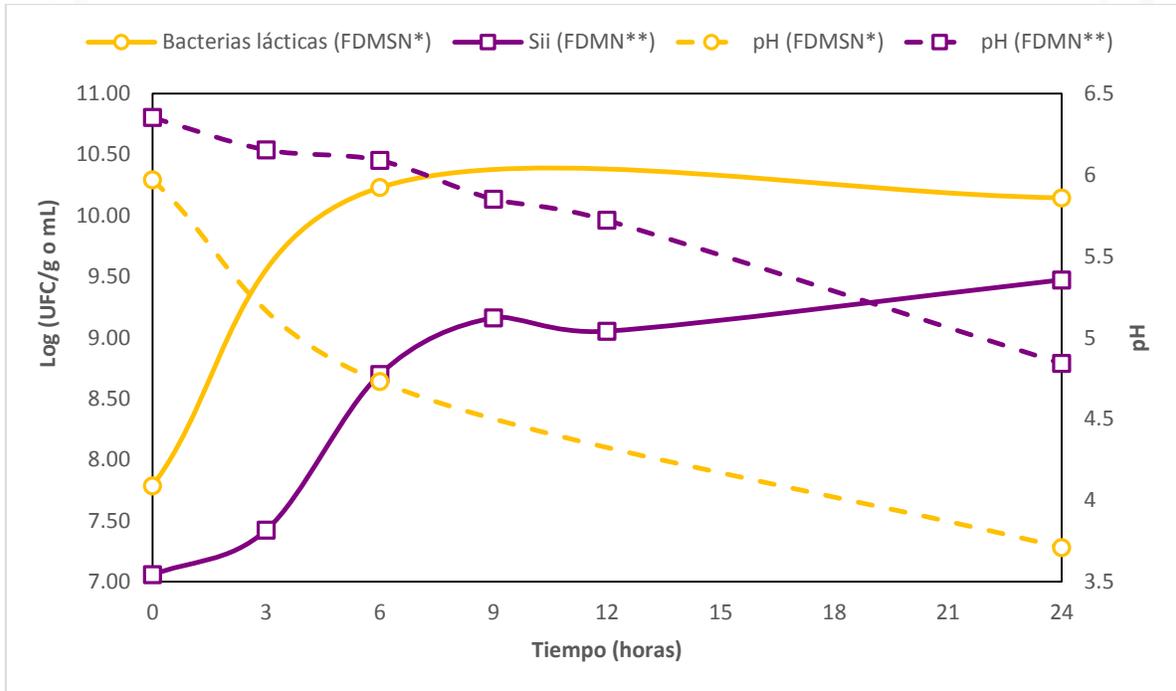


Figura 13.- Concentración de bacterias lácticas y valores de pH en fermentación dirigida en masa de maíz nixtamalizado y sin nixtamalizar

*FDMSN: Fermentación dirigida en masa sin nixtamalizar

**FDMN: Fermentación dirigida en masa nixtamalizada

El pH inicial de la masa de maíz sin nixtamalizar fue de 5.97 y disminuyó 2.26 unidades a las 24 horas, para la masa de nixtamal, el pH inicial fue de 6.35 y disminuyó 1.51 unidades a las 24 horas; en la masa de maíz sin nixtamalizar el descenso fue mayor y esto se debe posiblemente a que existía más de una especie de bacterias lácticas fermentando la masa. También puede deberse a las diferencias en la composición química provocados por la nixtamalización o a la presencia de microambientes con valores de pH más elevados.

- ***Determinación de azúcares reductores***

En la masa de maíz sin nixtamalizar la concentración inicial de azúcares reductores en la fermentación natural fue de 5.063 mg/mL y en la



fermentación dirigida de 4.287 mg/mL. En la figura 14 se observa que a las 6 horas tanto en la muestra control como en la dirigida aumentan a 8.440 mg/mL y 6.803 mg/mL, respectivamente, sin embargo a las 24 horas la muestra control sigue aumentando hasta 11.615 mg/mL y la muestra dirigida disminuye a 5.162 mg/mL. Esto significa que, posiblemente, los carbohidratos generados en la fermentación dirigida fueron consumidos por los microorganismos para su crecimiento.

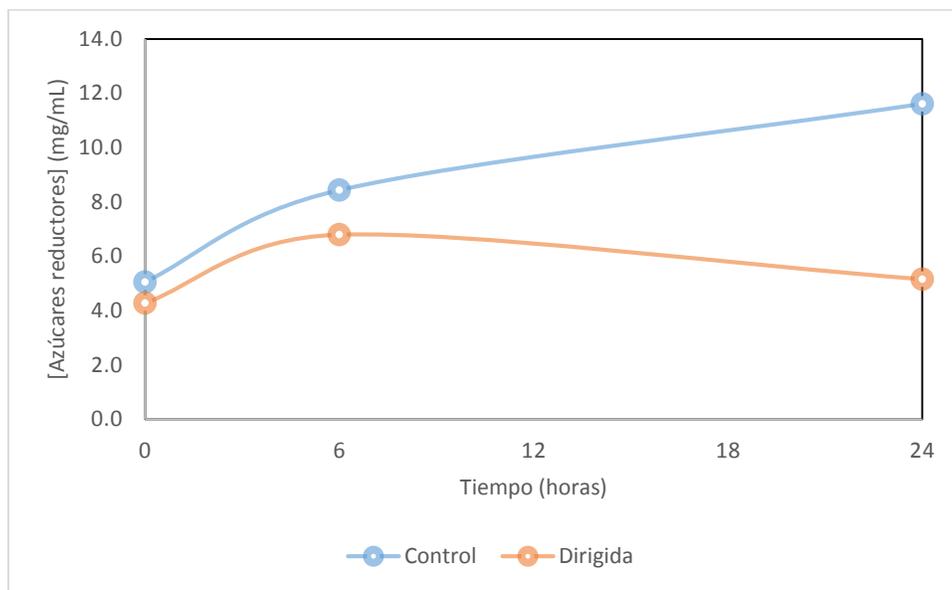


Figura 14.- Variación de la concentración de azúcares reductores durante la fermentación control y dirigida en masa de maíz sin nixtamalizar, usando maíz de Tehuacán, Puebla.

En el caso de la masa de nixtamal, se encontró que la concentración de carbohidratos reductores fue menor que el de las masas utilizadas en el estudio de anterior. Es posible que el tipo de maíz y el tratamiento al que fue sometido, en el caso del maíz nixtamalizado, influyan en el contenido de dichos carbohidratos. En el tiempo cero la fermentación control, la concentración de azúcares reductores fue de 0.962 mg/g y 1.065 mg/g en la fermentación dirigida. En la figura 15 se puede apreciar que la



concentración casi no aumenta, esto se debe posiblemente, a que los carbohidratos reductores producidos son consumidos inmediatamente por los microorganismos, coincidiendo con el aumento en su concentración. De las 24 horas en adelante se observó que la concentración fue mayor en la fermentación de masa de nixtamal inoculada, esto debido a que se tiene mayor concentración de Sii-25124, bacteria con actividad amilolítica, que va hidrolizando el almidón presente en la muestra.

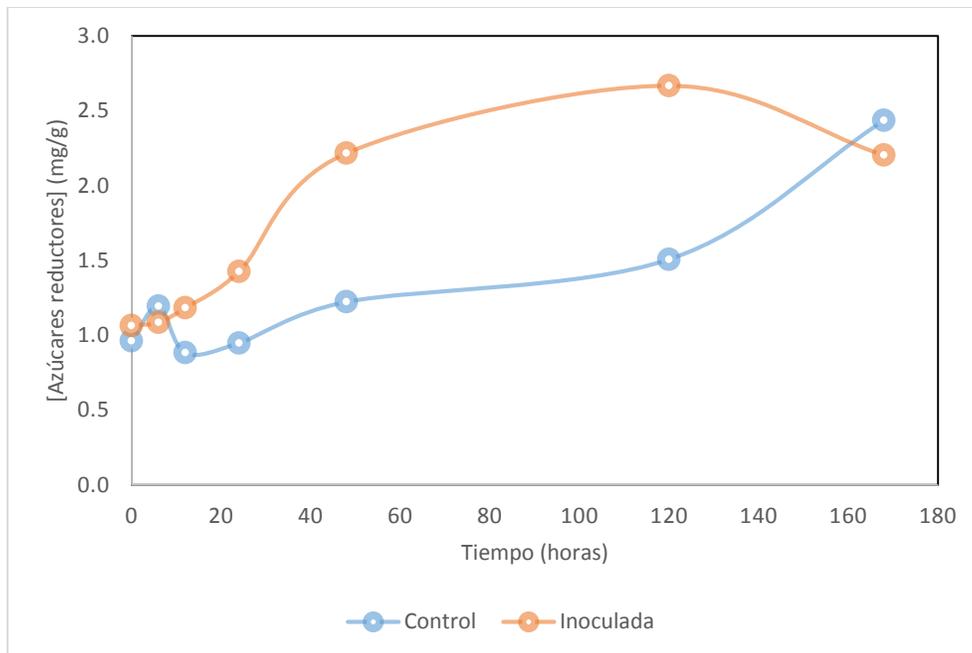


Figura 15.- Variación de la concentración de azúcares reductores durante la fermentación de masa de nixtamal control e inoculada

- ***Determinación de azúcares totales solubles***

En las muestras de la fermentación control de masa de maíz sin nixtamalizar, se obtuvieron resultados no esperados, ya que los azúcares totales solubles mostraron una tendencia al aumento en lugar de disminuir su concentración (figura 16), mientras que en la fermentación



dirigida, se dio un descenso en primeras 6 horas, aumentando su concentración a las 24h. Estas variaciones, posiblemente se deban a la heterogeneidad de las muestras, a la presencia de fracciones sin moler de endospermo, germen y pericarpio del maíz.

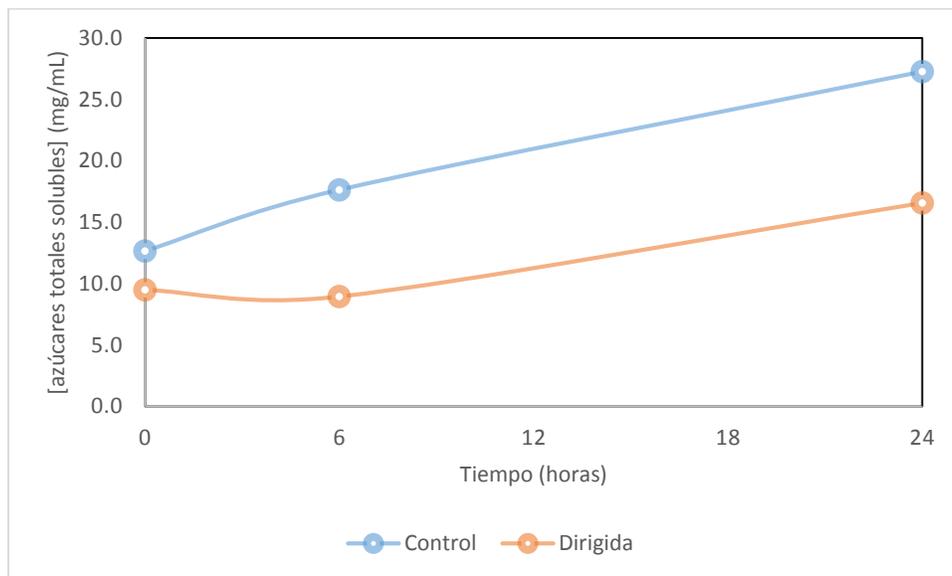


Figura 16. - Concentración de azúcares totales solubles durante la fermentación control y dirigida de masa de maíz sin nixtamalizar usando maíz de Tehuacán, Puebla.

Al igual que los azúcares reductores en la masa de maíz nixtamalizada, la concentración de azúcares totales solubles fue menor que en la masa de maíz sin nixtamalizar. Al igual que en la fermentación masa de maíz sin nixtamalizar, se esperaba una reducción en la concentración de carbohidratos totales mientras las bacterias lácticas aumentaban pero no sucedió así (figura 17). Previamente, ya se mencionó los problemas que se presentaron con la heterogeneidad de las muestras.

En la muestra de masa de nixtamal control no se esperaba que existieran cambios en las concentraciones de carbohidratos, sin embargo esta masa



fue contaminada posiblemente por la cepa de estudio, pudiéndose modificar la concentración de carbohidratos totales presentes.

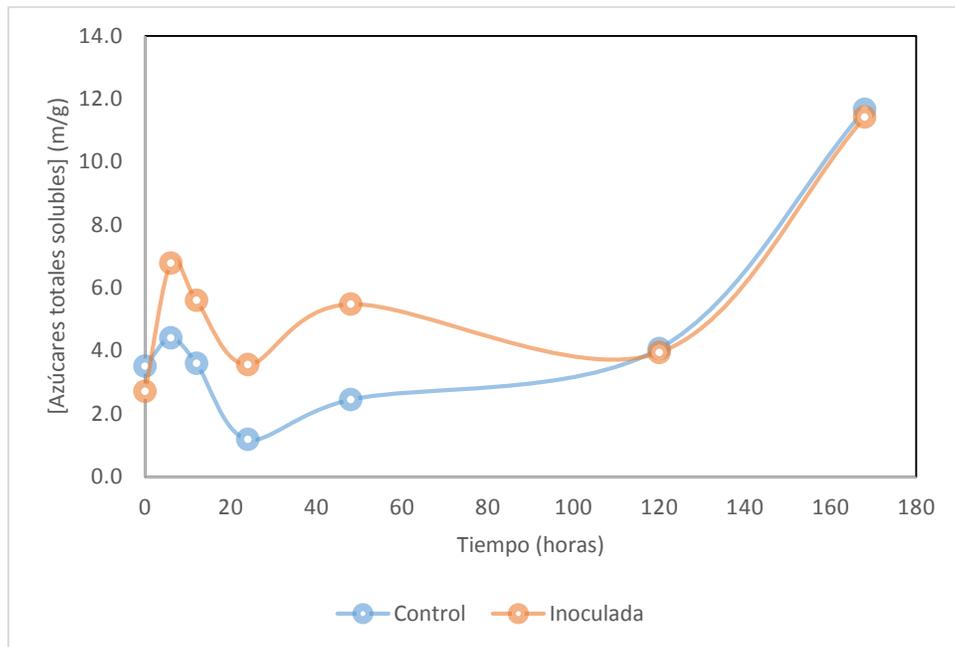


Figura 17.- Variación de la concentración de azúcares totales solubles durante la fermentación de masa de nixtamal control e inoculada



Conclusiones

1. Se obtuvieron productos fermentados con características microbiológicas y fisicoquímicas similares a las del pozol y del atole agrio mediante la fermentación de maíz nixtamalizado y no nixtamalizado inoculadas con las cepas A1MS3 y Sol10 identificadas previamente como *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*.
2. *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* 24124, inoculada en masa de Villahermosa, Tabasco creció en una masa de maíz nixtamalizada e irradiada, alcanzando cuentas similares a las de las bacterias lácticas del pozol. Acidificó la masa, generando los cambios más significativos dentro de las primeras 48 horas.
3. Las bacterias lácticas siguieron una tendencia similar de crecimiento en ambos sustratos; sin embargo en la fermentación en masa de maíz sin nixtamalizar se obtuvo un valor más bajo.



Perspectivas

1. Para la fermentación dirigida con bacterias lácticas en masa de maíz sin nixtamalizar, realizar muestreos en intervalos de tiempo más cortos para tener noción del comportamiento de los microorganismos en las primeras horas de fermentación.
2. Diseñar un medio de cultivo diferencial específico para los cultivos iniciadores empleados, con el fin de dar seguimiento en su crecimiento excluyendo a los microorganismos propios del alimento.
3. Realizar análisis con otros cultivos mixtos de bacterias lácticas.
4. Analizar parámetros sensoriales en ambas fermentaciones.



Bibliografía

1. Ben Omar N. y Ampe F. (2000) "Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol". *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9), 3664-3673
2. Blandino, A., M. E. Al-Aseeri S. S. Pandiella, 2003. "Cereal-based fermented foods and beverages". *Food Research International*, 36(6), pp. 527-543
3. Bolaños S. (2004). "Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras del pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizantes (DGGE)." Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 15-24
4. Cañas A., Bárzana E., Owens D., Wachter M. (1993). "Estudio de la variabilidad en los métodos de producción del pozol en los altos de Chiapas". En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Compilado por Wachter M. y Lappe P. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección General de Publicaciones, pp. 69-74
5. Caplice E., Fitzgerald G. (1999) "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation". *International Journal of Food Microbiology*. 50: 131-149
6. Chapter 5. "Current status and options for biotechnologies in food processing and in food safety in developing countries." En: *Biotechnologies for agricultural development*. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/i2300e/i2300e.pdf>
7. Cruz-Ulloa S. Ulloa M. 1973. *Rev. Soc. Mex. Historia Natural* 34: 423



8. **Díaz G. y Wachter C. 2003. "Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados".** Revista Latinoamericana de Microbiología. 45: 1-2.
9. **Díaz G., Ruiz F., Morlon-Guyot J. y Wachter C. (1999) "Diversidad de bacterias lácticas amilolíticas del pozol".** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
10. **Díaz-Ruiz G., Guyot J., Ruiz-Terán F., Morlon-Guyot J. and Wachter, C. (2003). "Amylolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementray foods?."** Food-based Approaches for a Healthy Nutrition, pp. 23-28
11. **Díaz-Ruiz G., Guyot J., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot J. and Wachter, C. (2003). "Microbiology and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize dough."** Applied and Environmental Microiology. 69 (8), 4367-4374
12. **Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, 28:3:350-356**
13. **Escalante A., Wachter C. and Farrés A. (2001) "Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican Fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis."** International Journal of Food Microbiology 64: 21-31
14. **European Food Information Council (EUFIC). "Bacterias probióticas-la investigación continúa...". Food to day. Boletín del consejo europeo de información sobre la alimentación.**



15. F.A.O. O.M.S. 2001. "Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics". FAO and OMS Expert Consultation Report. Working group Report (online).
16. F.A.O., 2010. "Las biotecnologías en la agroindustria en los países en desarrollo".
17. Gil A., 2010. "Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos". 2ª Edición. Madrid. Editorial médica panamericana.
18. Haard, N., Odufunda, S., Lee, C., Quintero, R., Lorence, A. y Wachter, C. 1999. "Fermented cereals: a global perspective". Roma: FAO
19. Herrera P., Min Know Y., Ricke S.C. (2009) "Ecology and pathogenicity of gastrointestinal Streptococcus bovis." *Anaerobe*, Vol. 15 pp. 44-54
20. Herrera T. (1993). "Semblanza del estudio de bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos". En *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Wachter C. y Lappe P. 1993. UNAM, C. U. México D. F. 21-16 pp.
21. Howlett J. (2008). "Functional Foods - From Science to Health and Claims". ILSI EUROPE Concise Monography Series.
22. James C. S. (1999). "Analytical Chemistry of Foods". Second Edition, ASPEN Publishers. New York
23. Jans C., Gerer A., Bugnard J., Njage P., Lacroix C., Meille L. (2012). "Novel Streptococcus infantarius subsp. Infantarius variants harboring lactose metabolism genes homologous of Streptococcus thermophiles." *Food Microbiology*. Vol. 31, pp. 33-42



24. Jensen P. y Hammer K. 1993. "Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*". *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12): 4363-4366

25. Katina K., Maina N., Juvonen R., Flander L., Johansson L., Virkki L., Tenkanen M. and Laitila A. (2009) "In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough". *Food Microbiology.* Vol. 26, pp. 734-743

26. Leroy F. y De Vuyst L. (2004) "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry". *Trends Food sci. technol.* Vol. 15, pp. 67-78.

27. Madigan M., Martinko J., Parker J., (2008) Brock, "Biología de los microorganismos". 10ª Edición. Madrid: Pearson

28. Martinez-Cuesta. 1997. "Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* and *Lactobacillus* ssp. *Casei*. Cell lyses induced by a crude bacteriocin". *Int. J. Food Microbiol.* 38(2-3):125-131

29. Nuraida L., Wachter M. and Owens J. (1995) "Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough," *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 11, pp. 567-571

30. Papagianni M. y Papamichael E. (2014). "Plasmid transformation of *Weissella paramesenteroides* DX by electroporation." *Anaerobe.* Vol. 30, pp. 60-64



31. Parra R. A., (2012). Review. **"Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos"**. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 8 No. 1 Colombia, pp. 93-105
32. **R. Talon and S. Leroy (2014) "Fermented meat products and the role of starter cultures."** Encyclopedia of Food Microbiology. Fermented foods. Vol. 1, pp. 870-874
33. Ramirez C., Rosas P., Velazquez Y., Armando J., Arce F. (2011) **"Bacterias lacticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud"**. Revista Fuente Año 2, No. 7, abril-junio 2011
34. **Ray, B. y Bhunia A. (2008) "Microorganisms used in food fermentations". "Biochemistry of some beneficial traits" "Food biopreservatives of microorganisms" y "Foodborne infections"**. En: Fundamental Food Microbiology, 4^a ed. CRC Press, Estados Unidos, pp. 99-106, 107-112, 178-185 y 283-293
35. **Riviera A. (2001) "Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol."** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México
36. **Rodríguez A., Villalva B. (2010). "Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol"**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
37. **Ross P., Morgan S. y Hill C. (2002) "Preservation and fermentation: past, present and future"**. International Journal of Food Microbiology. 79: 3-16
38. **Ruoff K. and Bisno A. "Classification of Streptococci."** p. 2283
39. **Salminen S. y Von Wright A. (1993). "Lactic Acid Bacteria"**. Marcel Dekker Ltd., New York, 211-442 pp.



40. Serna L., Valencia L. y Campos R. (2010) **"Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of Weissella confusa against Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae."** Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia, No. 55, pp. 55-65
41. **Seseña S. (2007) "Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de almagro". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias del Medio Ambiente. Universidad de Castilla-La Mancha.**
42. **Steinkraus K. (Ed.) (1995). "Handbook of Indigenous Fermented Food" 2ª ed. USA p. 776**
43. **Steinkraus, K. (2002) "Fermentations in World Food Processing".** Comprehensive reviews in food science and food safety. Institute of Food Technologists. Vol. 1
44. **Todar K. (2011) "Lactic acid bacteria." En: Todar's Online Textbook Of Bacteriology (En línea) Disponible en: http://textbookofbacteriology.net/lactics_3.html consultado el 03-02-16**
45. **Ulloa M., Herrera T. y Lappe P. (1987) "Fermentaciones tradicionales indígenas de México." Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista, Vol. 16, pp. 13-20**
46. **Valderrama, A., 2012. "Diversidad de bacterias lácticas del atole agrío de Villahermosa, Tabasco". Tesis de Licenciatura en Química de alimentos. UNAM**



47. Van N, y Hahn-Hagerdal B. (1999). "Nutrient requirements of Lactococci in defined growth media". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(5): 617-627

48. Wachter C. (2014) "La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados", Vol. 15 Núm. 8 ISSN 1607 - 6079 Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/>
49. Wachter C. y Lappe P. (1993). "Alimentos fermentados indígenas de México". UNAM, C. U. México D. F.
50. Wachter C., Cañas A., Bárzan E., Lappe P., Ulloa M. and Owens D. (2000) "Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations". *Food Microbiology* 17: 251-256
51. Wachter C., Cañas A., Cook E., Bárzana E. y Owens D. (1993) "Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican ferments maize dough." *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* Vol 9, pp. 269-274
52. Wullschleger S., Lacroix C., Bonfoh B., Sissoko-Thiam A., Hugenschmidt S., Romanens E., Baumgartner S., Traoré I., Yaffe M., Jans C., Meile L. (2013). "Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model". *International Dairy Journal.* Vol. 29, pp. 28-35



Apéndice 1

Curvas estándar de azúcares reductores. Método ácido dinitrosalicílico (DNS) (James, 1999)

Tabla 9.- Datos de curvas estándar de glucosa para azúcares reductores.

Masa de Tehuacán, Puebla		Masa de nixtamal Villahermosa, Tabasco			
Curva 1		Curva 2		Curva 3	
Glucosa mg/mL	Promedio Abs a 540 nm	Glucosa mg/mL	Promedio Abs a 540 nm	Glucosa mg/mL	Promedio Abs a 540 nm
0.2	0.307	0.1	0.126	0.1	0.073
0.4	0.703	0.2	0.323	0.2	0.242
0.6	1.112	0.3	0.530	0.3	0.445
0.8	1.516	0.4	0.702	0.4	0.637
1	1.879	0.5	0.900	0.5	0.824
-	-	-	-	0.6	1.040

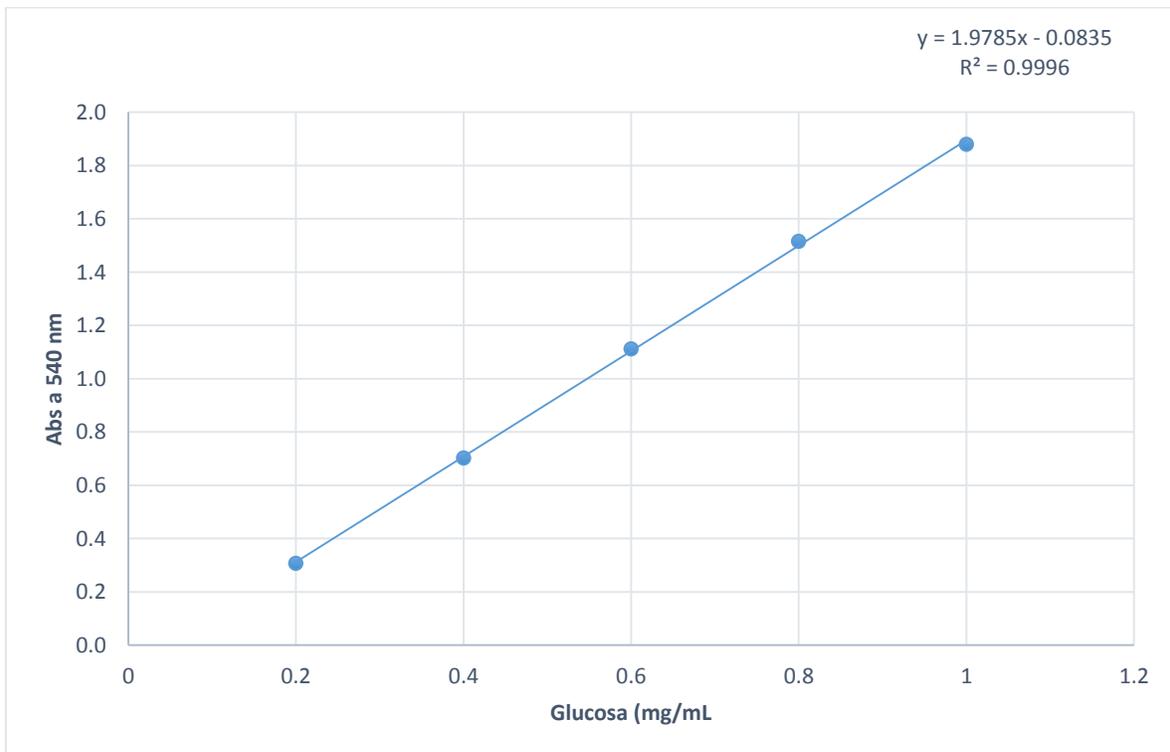


Figura 18.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 1)

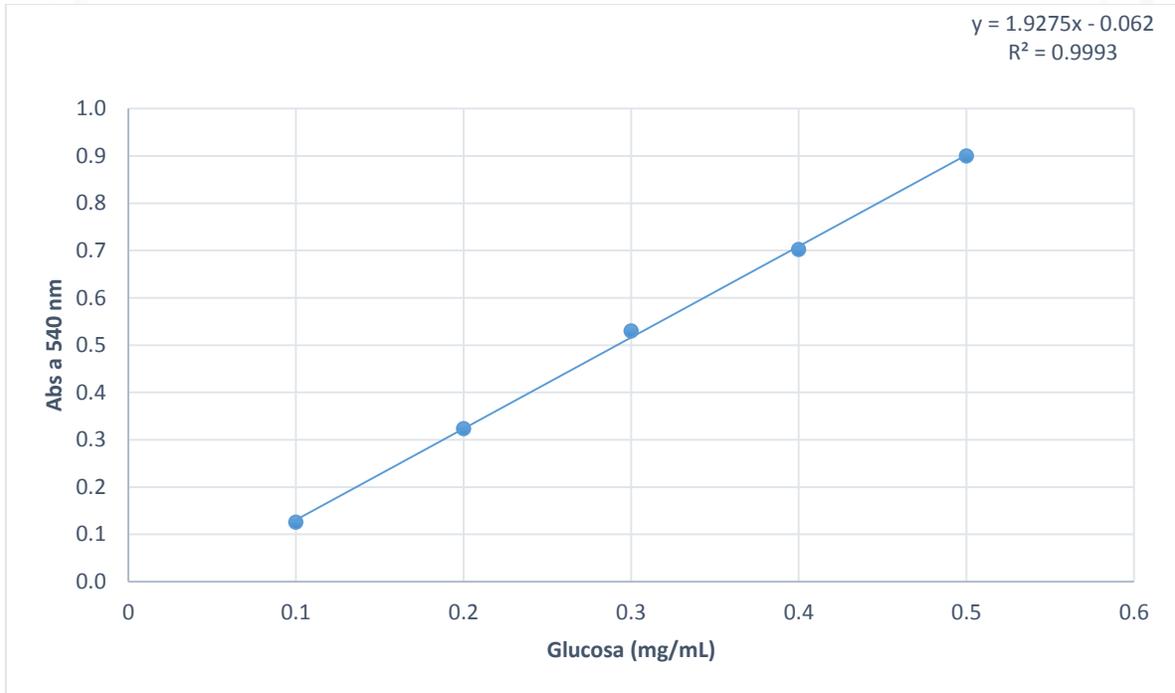


Figura 19.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 2)

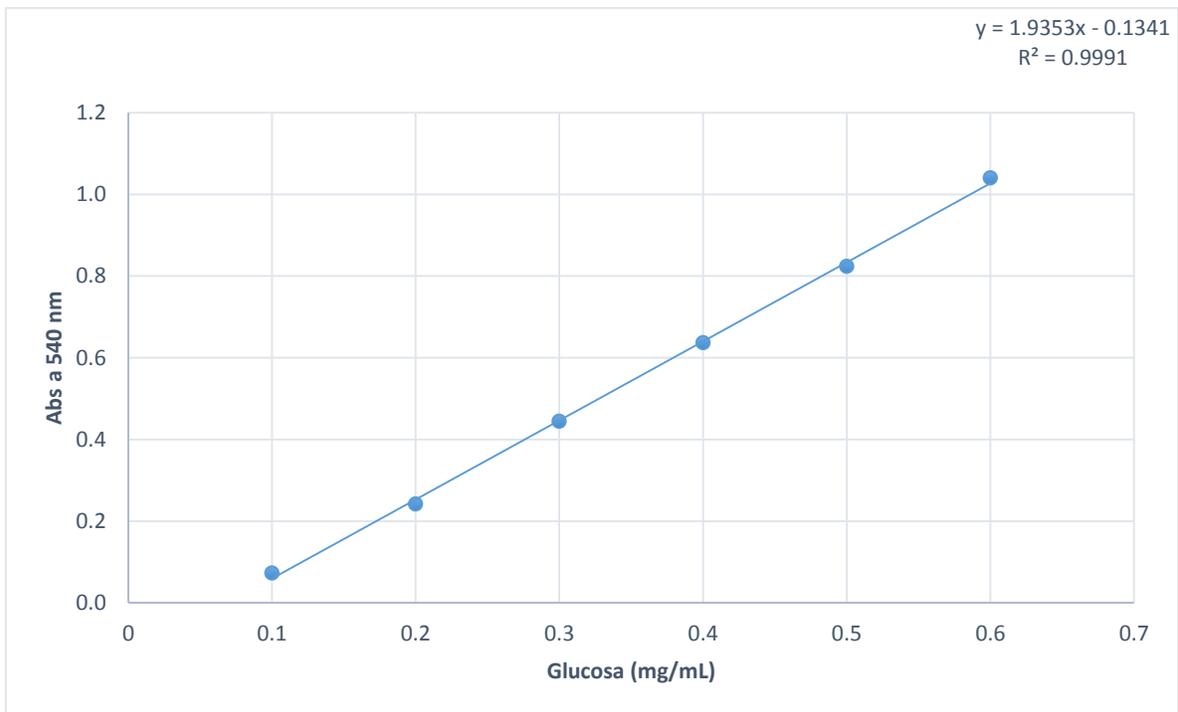


Figura 20.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 9 (Curva 3)



Apéndice 2

Curvas estándar de azúcares totales solubles. Método de fenol-sulfúrico (F-S) (Dubois, et al., 1956)

Tabla 10.- Datos de curvas estándar de glucosa para azúcares totales solubles

Masa de Tehuacán, Puebla		Masa de nixtamal Villahermosa, Tabasco	
Curva 1		Curva 2	
Glucosa $\mu\text{g/mL}$	Promedio Abs a 480 nm	Glucosa $\mu\text{g/mL}$	Promedio Abs a 480 nm
10	0.169	10	0.161
25	0.306	20	0.284
35	0.451	40	0.598
50	0.582	60	0.778
100	1.235	80	0.980

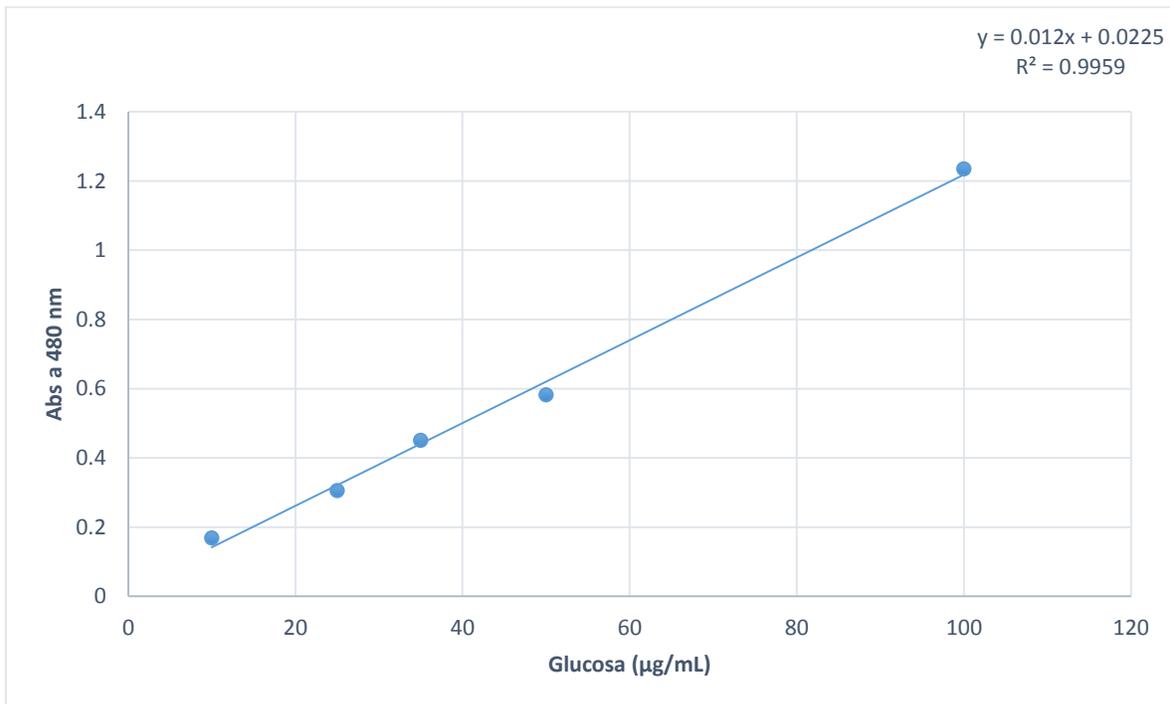


Figura 21.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 10 (Curva 1)

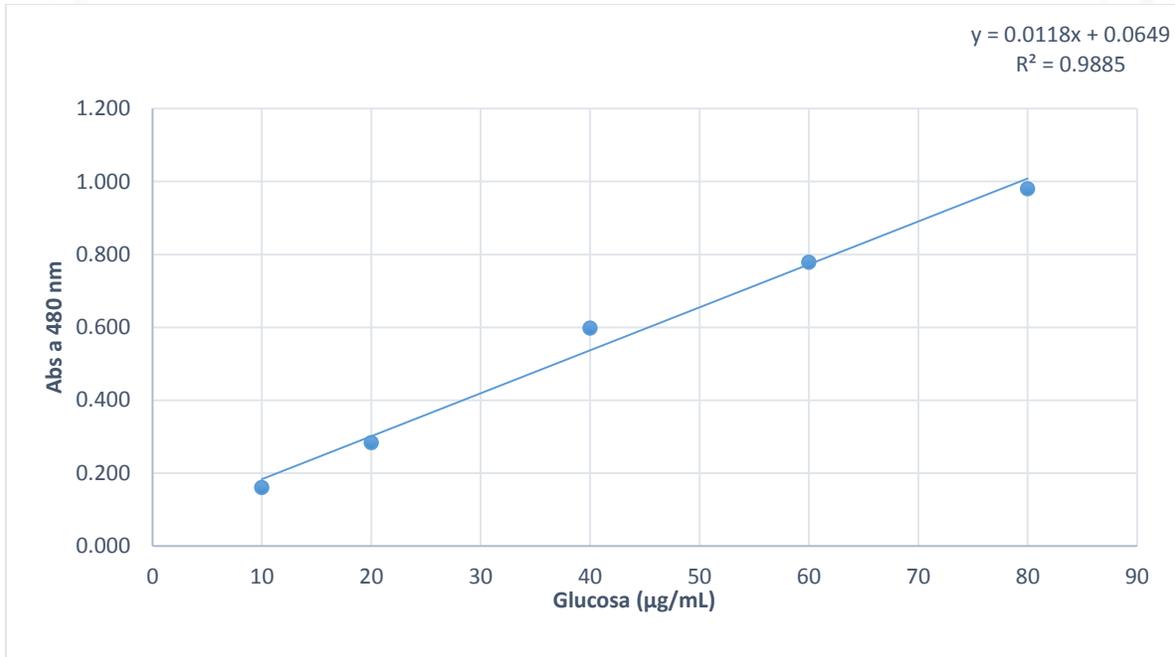


Figura 22.- Curva patrón de glucosa a partir de los datos de la Tabla 10 (Curva 2)



Apéndice 3

Diluciones para el estudio microbiológico de las fermentaciones de masa de maíz sin nixtamalizar

Tabla 11.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación natural de masa de maíz sin nixtamalizar (Atole agrio).

Tiempo de muestreo (h)	Diluciones a sembrar	Medios de cultivo*
0	-1, -2, -3	MRS, BRVA
	-2, -3, -4	PCA
	-3, -4, -5	PDA
6	-3, -4, -5	MRS, PCA
	-5, -6, -7	PDA
24	-4, -5, -6	MRS
	-5, -6, -7	PCA, PDA
	-3, -4, -5	BRVA

* Agar cuenta en placa (PCA), agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta (BRVA) y agar papa dextrosa (PDA)

Tabla 12.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación dirigida con bacterias lácticas de masa de maíz sin nixtamalizar (Atole agrio).

Tiempo de muestreo (h)	Diluciones a sembrar	Medios de cultivo*
0	-4, -5, -6	MRS, PCA
	-5, -6, -7	PDA
	-2, -3, -4	BRVA
6	-7, -8, -9	MRS
	-6, -7, -8	PCA, PDA
	-2, -3, -4	BRVA
24	-7, -8, -9	MRS, PCA, PDA
	-1, -2, -3	BRVA

* Agar cuenta en placa (PCA), agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta (BRVA) y agar papa dextrosa (PDA)



Apéndice 4

Diluciones para el estudio microbiológico de las fermentaciones de masa de maíz sin nixtamalizado.

Tabla 13.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación natural de masa de maíz nixtamalizado estéril (Pozol).

Tiempo de muestreo (h)	Diluciones a sembrar	Medios de cultivo*
0	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
3	-2, -3, -4	MRS, PCA,
6	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
9	-2, -3, -4	MRS, PCA,
12	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
24	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
48	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
120	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA
168	-2, -3, -4	MRS, PCA, BRVGA

* Agar cuenta en placa (PCA), agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta con glucosa (BRVGA)

Tabla 14.- Diluciones empleadas en el estudio de la fermentación dirigida con bacteria lácticas de masa de maíz nixtamalizado estéril (Pozol).

Tiempo de muestreo (h)	Diluciones a sembrar	Medios de cultivo*
0	-4, -5, -6	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
3	-4, -5, -6	MRS, MASSW
6	-5, -6, -7	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
9	-6, -7, -8	MRS, MASSW
12	-6, -7, -8	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
24	-6, -7, -8	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
48	-6, -7, -8	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
120	-6, -7, -8	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA
168	-7, -8, -9	MRS, MASSW
	-2, -3, -4	PCA, BRVGA

* Agar cuenta en placa (PCA), agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), agar bilis rojo violeta con glucosa (BRVGA) y agar MASSW