



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO CINETICO COMPARATIVO DE LA FERMENTACION DE MASA DE POZOL ELABORADA EN DOS CONDICIONES HIGIENICAS DISTINTAS

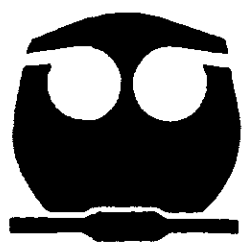
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

VANESSA DEL CARMEN CABRA LEDESMA



MEXICO, D. F.

283833

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

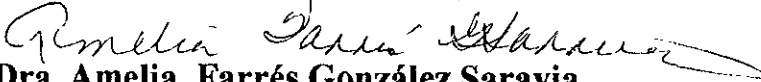
JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
Vocal	Prof. Marcos Francisco Báez Fernández
Secretario	Prof. Amelia Farrés González Saravia
1er. suplente	Prof. Aurora Irma Ortegón Ávila
2do suplente	Prof. María del Rocío Santillana Hinojosa


Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO 312 CONJUNTO "E" FACULTAD DE
QUÍMICA

Directora de la Tesis:


Dra. Amelia Farrés González Saravia

Supervisor técnico:


Dr. Francisco Ruiz Terán

Sustentante:


Vanessa Del Carmen Cabra Ledesma



INGENIEROS PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto global

“Determinación de la diversidad microbiana del pozol”

coordinado por la Dra. María del Carmen Wachter

Rodarte.

AGRADECIMIENTOS

A las dos personas que mas quiero en este mundo,. De quienes he recibido todo el amor, la comprensión, el cariño , el ejemplo y el apoyo, quienes han estado siempre junto a mí. Los amo.

MAURI Y JOSÉ

Mis papás

A mis hermanos, José y Alejandro, no imagino la vida sin ustedes, los quiero mucho

A mi abuelita, porque sé que donde quiera que esté, vela por mí en todo momento

A mis primos y tíos, por sus muchas palabras de aliento

A mi padrino, por creer siempre en mí

A mis amigos Carmen, Paty, Martha, Miguel y Elizabeth, por su apoyo incondicional y su valiosa y verdadera amistad

A mis compañeras de laboratorio, por crear un ambiente de trabajo increíble

A la Dra. Amelia Farrés, por su confianza , apoyo, sabios consejos e inigualable forma de ser tan especial. Es genial..

Al maestro Francisco Ruiz, por estar siempre dispuesto a ayudarme y resolver las mil dudas que surgieron durante la elaboración de este trabajo. Mil gracias.

A la maestra Francisca Iturbe, al maestro Marcos Francisco Báez y a la maestra Aurora Irma Ortegón, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la maestra Rocío Santillana, por su ayuda en momentos importantes del desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Carmen Wachter, porque la distancia no fue impedimento para contar con ella.

A las maestras Lucy Cornejo e Idalia Flores, por sus sabios y a la vez divertidos consejos.

A los maestros Alejandro L., Rjna González y Patricia Martínez, muchas gracias por todo, si hubiera mas personas como ustedes este mundo sería mejor.

Al personal de la Escuela de Medicina de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	PÁGINA
1.- Resumen	4
2.- Introducción	6
3.- Antecedentes	
Fermentación acidoláctica en alimentos	8
Las bacterias lácticas	11
Alimentos fermentados mexicanos de maíz	14
El maíz	
Composición del maíz	16
Nixtamalización	17
El pozol	
Microbiología del pozol	21
Planteamiento del problema	24
4.- Objetivos	25
5.- Materiales y métodos generales	
Selección de los lugares de muestreo	26
Descripción de las muestras	26
Análisis microbiológicos	
Cuenta viable de bacterias lácticas	28
Cuenta viable de bacterias mesófilas no lácticas	28

Cuenta viable de enterobacterias	28
Cuenta viable de mohos y levaduras	28
Análisis fisicoquímicos	
Determinación de humedad	29
Determinación de pH	29
Determinación de la acidez titulable	29
Cuantificación del almidón soluble	30
Cuantificación de sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético por HPLC	31
Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula	33
6.- Resultados y Discusión	
Estudio de campo	38
Análisis microbiológicos	
Comportamiento de las bacterias lácticas	43
Comportamiento de las bacterias mesófilas	43
Comportamiento de las enterobacterias	45
Cuentas iniciales y finales de hongos y levaduras	47
Análisis fisicoquímicos	
Humedad	48
pH	48
Acidez titulable	49

Cuantificación de los ácidos generados durante la fermentación	
Ácido láctico	54
Ácido acético	55
Acido fórmico	56
Cuantificación del almidón soluble	58
Actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula	58
Cuantificación de los azúcares presentes durante la fermentación	
Disacáridos	60
Glucosa	62
Fructosa	64
7.- Conclusiones	67
8.- Recomendaciones	70
9.- Apéndices	
Apéndice 1) Composición de los medios MRS y ACP	71
Apéndice 2) Curva patrón para la cuantificación del almidón soluble	72
Apéndice 3) Curvas de calibración para la cuantificación de sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético	73
Apéndice 4) Cromatogramas de las muestras	77
Apéndice 5) Curvas patrón para la determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula	81
10.- Bibliografía	83

1.- RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de la población microbiana en muestras de masa de pozol elaborada bajo diferentes condiciones higiénicas. Para ello, se seleccionaron 2 pozolerías de la ciudad de Villahermosa, Tabasco en las cuales se sigue básicamente el mismo proceso de elaboración de la masa de pozol pero cuyas condiciones higiénicas difieren básicamente en 4 aspectos: limpieza del lugar, calidad del agua utilizada, exposición a corrientes de aire y utilización de redes para el cabello y guantes por parte del personal.

Se investigó la influencia del grado de aireación de la masa en el desarrollo de la microbiota mediante el monitoreo de los cambios en las cuentas totales (bacterias lácticas, bacterias mesófilas no lácticas, enterobacterias y hongos y levaduras), de la variación en los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable, humedad y actividad acuosa) y del cambio en la concentración de diversos compuestos, resultado del metabolismo microbiano (almidón soluble, disacáridos, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico).

Se encontraron presentes en la masa de pozol bacterias lácticas, bacterias mesófilas totales, enterobacterias, hongos y levaduras en un estudio seguido durante 74 h de fermentación.

No se presentaron diferencias entre niveles de población alcanzados por cada grupo durante el tiempo de fermentación muestreado para cada tipo de muestra.

Se determinó que las condiciones de proceso menos higiénicas repercuten en una mayor variabilidad del comportamiento metabólico de los integrantes constituyentes de cada grupo.

La masa elaborada en las condiciones menos higiénicas sufrió una mayor pérdida de humedad durante la fermentación, un descenso más rápido del pH y presentó una mayor disponibilidad de almidón soluble al inicio de la fermentación.

Las zonas aerobias de las masas de pozol perdieron más humedad que las zonas microaerobias durante la fermentación.

En las condiciones de proceso menos higiénicas se presentaron los mayores valores de acidez titulable.

Las zonas aerobias de las masas muestreadas presentaron mayores valores de acidez titulable al final de las 74 h de fermentación, siendo que la de la masa elaborada en las condiciones menos higiénicas registró un valor mayor. El aumento en los valores de acidez titulable estuvo relacionado con el crecimiento de las bacterias lácticas, mientras que no afectó el número de

bacterias mesófilas totales y estuvo acompañado de la disminución de la población de enterobacterias, sin embargo, no se observó la desaparición de este grupo durante las 74 h de fermentación de la masa.

Se detectó mayor producción de ácido láctico y acético en la zona aerobia de la muestra elaborada en las condiciones menos higiénicas hacia el final de la fermentación.

Se registró actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula en ambas muestras y zonas de la masa, además de que se detectó un efecto inhibitorio en presencia de concentraciones elevadas de disacáridos y glucosa.

2.- INTRODUCCIÓN

El pozol (del náhuatl *pozolli*, espumoso) es una bebida de masa de maíz fermentada que suspendida en agua es consumida como bebida ceremonial y alimento básico por poblaciones indígenas del sureste de México y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1976 - 1982).

La fermentación del pozol se lleva a cabo en estado sólido y de forma espontánea, es decir, no se adiciona inóculo alguno, lo que involucra el desarrollo de una microbiota mixta en un sustrato complejo compuesto de carbohidratos, lípidos y proteínas.

El proceso de la fermentación del pozol ha sido objeto de diversos estudios cuya finalidad ha sido el avanzar en su comprensión.

Herrera, Ulloa, Taboada y colaboradores han realizado estudios extensos sobre la micología de la fermentación (Wacher, 1995), mientras que Wacher y colaboradores se han enfocado al estudio de la microbiología del pozol en sus tres principales aspectos: la ecología microbiana, la fisiología y la taxonomía.

El propósito de este trabajo es estudiar el proceso de fermentación de la masa de pozol elaborada bajo 2 condiciones higiénicas distintas en cuanto al comportamiento de los principales grupos de microorganismos, de los parámetros fisicoquímicos, de la concentración de los metabolitos y almidón soluble generados en dicho proceso y de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula. Debido al hecho de que la fermentación se realiza en estado sólido, no existe homogeneidad en toda la masa en cuanto al grado de aireación, lo que lleva también a investigar en el presente estudio la existencia de microambientes y sus efectos en cada uno de los aspectos señalados.

3.- ANTECEDENTES

El pozol es un alimento resultado de la fermentación sucesiva de bacterias, levaduras y hongos de masa de maíz (*Zea mays L*) nixtamalizada.

Las bacterias del pozol han sido poco estudiadas. Steinkrauss (1983) infiere que durante las primeras horas de fermentación predominan las bacterias lácticas, que quizás son las responsables de la producción del ácido láctico durante las primeras horas de fermentación, lo que fue confirmado posteriormente por Silva-Villarreal (1984), Mosqueda-González y Escamilla Hurtado (1988), Ramírez (1987) y Nuraida (1988), al concluir que las bacterias lácticas son predominantes y que son las causantes de la acidificación durante las primeras horas de fermentación.

El estudio sobre la microbiología del pozol realizado por Wachter (1995) confirma lo anterior, y recomienda la determinación de la concentración de azúcares simples para saber si el conjunto de estos constituye el sustrato fermentable o si las bacterias lácticas utilizan algún otro componente de la masa. Debido a que se trata de una fermentación láctica, también recomienda la cuantificación de los principales metabolitos finales asociados a este proceso fermentativo (ácido láctico, ácido acético, etanol y diacetilo) en los diferentes tipos de masas recién preparadas y en fermentación. También señala la posibilidad de la formación de microambientes debido a que la fermentación se lleva a cabo en estado sólido, lo que da origen a una heterogeneidad en cuanto al grado de aireación y a la composición química (zonas aerobia y microaerobia de la masa).

Díaz (1996) realizó un estudio del metabolismo de los principales carbohidratos solubles presentes en el maíz nixtamalizado (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa) por una bacteria láctica que predomina al inicio de la fermentación del pozol (*Leuconostoc Pz 12*) y encontró que dicha bacteria consumió inmediatamente la glucosa y utilizó parte de la fructosa como aceptor y parte como donador de electrones, sin agotarla. También demostró que existe un efecto de la presencia del oxígeno en la fermentación de sacarosa, produciéndose mayores concentraciones de ácido acético en condiciones aeróbicas.

En 1998, Sainz estudió la presencia y sobrevivencia de bacterias patógenas en muestras de masa de pozol elaboradas y expandidas en diversos mercados y pozolerías de la ciudad de

Villahermosa, Tabasco, encontrando cuentas altas al inicio de la fermentación que se reducían sin llegar a la desaparición a las 48 h.

En 1999, Ampe y colaboradores utilizando un método de cuantificación de ARN, caracterizaron y cuantificaron los grupos microbianos participantes en la fermentación de la masa de pozol proveniente de Tabasco. Este estudio confirma la presencia de *Leuconostoc spp* y *Lactococcus spp* al inicio de la fermentación y de *Lactobacillus spp* al final, así como la disminución de la cuenta de enterobacterias.

FERMENTACIÓN ACIDOLÁCTICA EN ALIMENTOS

Un alimento fermentado es el resultado de la transformación de un sustrato (comestible o no) por la actividad metabólica de microorganismos que, bajo condiciones adecuadas, lleva a la obtención de un producto apto para el consumo, con características sensoriales, nutrimentales y en algunos casos toxicológicas distintas a las del sustrato inicial.

Los alimentos fermentados juegan un papel muy importante en la alimentación mundial. Están presentes en cada continente (Steinkrauss, 1983).

La fermentación de alimentos presenta muchas ventajas, algunas de las cuales son:

- Es un método barato de conservación de los alimentos (Cooke, 1987; Nout & Motarjemi, 1997).
- Las características sensoriales de los productos fermentados (sabor, aroma, apariencia y consistencia) los hace mas atractivos para el consumidor que los ingredientes no fermentados (Steinkraus, 1971).
- En muchos casos el producto fermentado final es una importante fuente de proteínas, calorías y ciertas vitaminas (Wang, 1981)
- Reduce tiempos de cocción.
- En el caso de las leguminosas, mejora su digestibilidad para humanos (Van Veen & Steinkrauss, 1970) y mejoran la calidad del producto. En estos alimentos existen ciertos oligosacáridos, como la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa, que se asocian a la distensión abdominal y a la flatulencia. La fermentación reduce estos factores.
- Tanto los cereales como las leguminosas presentan una restringida biodisponibilidad de los nutrientes debido a la presencia de factores antinutricionales como lo son los

fitatos y los polifenoles (taninos). La fermentación permite disminuir los niveles de estos compuestos, y se ha visto que lleva a una mejor biodisponibilidad de los minerales y el almidón, así como a un incremento en el valor de eficiencia proteica (PER) (Nout, 1999).

- Eliminación de algunos compuestos potencialmente tóxicos como lo son, por ejemplo, los glucósidos cianogénicos (linamarina principalmente) (Nout et al, 1999).

Sin embargo, la fermentación de alimentos presenta ciertas desventajas:

- No todos los factores antinutricionales pueden ser degradados por los microorganismos, como lo son, por ejemplo, las lectinas y los inhibidores de proteasas, que se encuentran presentes en las leguminosas y sólo pueden ser inactivados por tratamiento térmico (Nout et al, 1999);
- El riesgo de contaminación por micotoxinas se incrementa debido al hecho de que muchos de los alimentos fermentados requieren de la participación de hongos, principalmente *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* y *Fusarium spp*. La fermentación puede eliminar una parte pero no todos, por lo que es necesario un tratamiento adecuado del sustrato antes de la fermentación para eliminar por completo dichas toxinas (Steinkrauss et al, 1983).

Existen dos tipos generales de fermentación de alimentos:

- a) En estado líquido: Llevadas a cabo en sustratos con un mínimo de 80% de humedad
- b) En estado sólido: Definida como “el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de líquido libre” (Canel, 1980).

Según Paredes & Harry (1988) los alimentos producidos por fermentación en estado sólido se pueden clasificar en:

- 1.- Alimentos producidos por fermentación fungal en estado sólido seguida de una fermentación en salmuera que puede o no llevarse a cabo en estado sólido.
- 2.- Alimentos producidos por fermentación en estado sólido llevada a cabo principalmente por bacterias.
- 3.- Alimentos producidos por una fermentación acidoláctica seguida de una fermentación fungal.
- 4.- Alimentos preparados de masas fermentadas.

5.- Alimentos producidos por fermentación alcohólica.

6.- Ingredientes de alimentos fermentados.

Como se puede observar en la tabla I, existe una gran diversidad de alimentos fermentados en estado sólido cuyo substrato principal es un cereal o fruto con elevado contenido de almidón, también cabe destacar la gran variedad de microorganismos que participan en dichas fermentaciones

Tabla I Ejemplos de productos amiláceos fermentados en estado sólido^a

TIPO DE FERMENTACIÓN	SUBSTRATO	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	ORIGEN GEOGRÁFICO
2	Soya y trigo	Shoyu	<i>Aspergillus oryzae</i> , bacterias y levaduras	Malasia
2	Soya y arroz	Miso	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>	China, Japón
3	Maíz	Kaanga	Bacterias y levaduras	Nueva Zelanda
5	Arroz	Idli	<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	India
5	Sorgo	Kisra	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Acetobacter</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sudán
5	Maíz	Pozol	Bacterias, levaduras y hongos	México
5	Maíz	Chicha	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., hongos y levaduras	Perú
5	Maíz	Kenkey	<i>Lactobacillus</i> spp., hongos y levaduras	África
5	Trigo	Kishk	<i>Bacillus</i> spp.	Medio Oeste
	Trigo	Jalebies	<i>Saccharomyces</i> spp.	India
5	Trigo	Pan agrio	<i>Torulopsis</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp.	Egipto posiblemente
6	Cassava	Tapé ketella	<i>Amylomyces rouxii</i>	Sureste de Asia
6	Arroz	Lao-chao	<i>Rhizopus chinensis</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus rouxii</i>	China
6	Maíz	Tapé jagung	<i>Aspergillus rouxii</i> , <i>Endomycopsis burtonii</i>	Indonesia
7	Cassava (Manihot esculenta)	Gari	<i>Candida</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.	Oeste de África
7	Arroz	Arroz quemado	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Ecuador

^aRecopilado por Paredes & Harry (1988).

Los principales cambios en la composición nutrimental que sufren los alimentos como resultado de la fermentación en estado sólido se dan en:

La composición proximal

La concentración de los componentes solubles

La composición de aminoácidos de los alimentos

La composición de vitaminas

LAS BACTERIAS LÁCTICAS:

Se ha demostrado que las responsables mas importantes de la fermentación acidoláctica en los alimentos son las bacterias lácticas.

Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, microaerofilicas y por obtener como producto principal de su metabolismo fermentativo a partir de carbohidratos al lactato (Kandler, 1983). Otras de sus características son el ser mesófilas, pero pueden crecer en un rango de 5-45°C, su pH óptimo es de 4-4.5, aunque se han encontrado cepas que crecen a pHs de 3.2 y 9.6; poseen poca actividad proteolítica y lipolítica, requieren de aminoácidos preformados, bases púricas y pirimídicas y vitamina B para crecer (Stamer, 1976; Cogan & Hill, 1993; Jay, 1996).

Algunas de las bacterias lácticas que con mayor frecuencia se encuentran en los productos fermentados son (Stiles,1997):

Homofermentadoras: *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. amyiophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp.

delbrueckii, *bulgaricus*, y *lactis*, *Pedicoccus* spp, *Streptococcus* spp y

Lactococcus spp.

Heterofermentadoras : *Lb. casei*, *Lb. arabinosis*, *Lb. plantarum*. *Lb. fermentum*,

Facultativas *Lb. brevis*, *P. acidilacti*, *Leuconostoc* spp

Heterofermentadoras : *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *P. pentosaceus*, *Lb. buchneri*,

Obligadas *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *weisella*

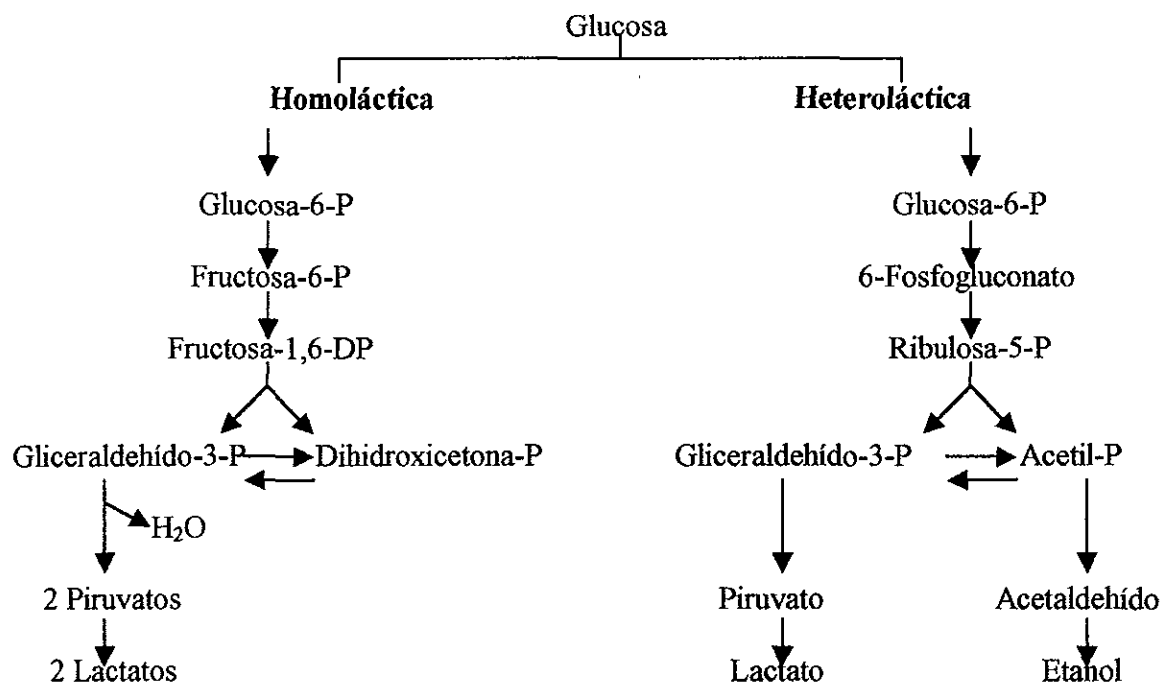


Figura 1. Esquema general de la fermentación de glucosa en las bacterias lácticas (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Bajo condiciones normales de fermentación, el producto del metabolismo homofermentativo (ej. *Lb. plantarum*) obtenido en mayores cantidades es el ácido láctico, pero también se forman otros productos, tales como el ácido acético, el acetaldehído, el etanol y el diacetilo (en lácteos), todos ellos forman parte o contribuyen con el sabor específico o característico del producto fermentado (Figura 1).

La principal función de este metabolismo de azúcares es generar la energía necesaria para lograr un rápido crecimiento y mantenimiento del pH intracelular durante la acidificación del medio ambiente. Este metabolismo se caracteriza por elevadas velocidades metabólicas y no por una eficiencia máxima de conservación de energía. Las reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa protege a las células de la acumulación de equivalentes reductores (NADH) que se forman durante la glicólisis y pueden causar inhibición directa en varios sitios de control metabólicos.

El resultado de estas actividades tan elevadas es el dominio de la población en ambientes con muchos nutrientes debido a la enorme ventaja competitiva sobre otros microorganismos que

también utilizan azúcares, y por otra parte, la rápida acidificación que inactiva a diversos microorganismos.

Se sabe que bajo condiciones inusuales, en especial bajo condiciones de baja concentración de azúcares y/o elevada aireación, se pueden formar otros metabolitos como el ácido acético, fórmico, acetoína y acetaldehído como resultado de la fermentación por bacterias lácticas (Hugenholtz & Kleerebezem, 1999).

La interferencia general microbiana es un mecanismo de control no específico común en todas las poblaciones y ambientes incluyendo los alimentos. Esto representa la inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos por otros miembros del habitat (Shinefield, 1971). Con objeto de operar eficientemente, la flora que interfiere con el crecimiento y desarrollo de las demás requiere aumentar su número muchas veces. Los mecanismos involucrados incluyen la competencia por nutrientes, la generación de un ambiente desfavorable y la competencia por los sitios de ataque/adhesión (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Los mecanismos de antibiosis mediados por bacterias lácticas son:

- a) Producción de ácidos orgánicos, acetaldehído y etanol.- Se cree que es debido a la acción de los ácidos en la membrana citoplasmática bacterial que interfieren con el mantenimiento del potencial de membrana por lo que se inhibe el transporte activo (De Vuyst & Vandamme, 1994 a)
- b) Producción de peróxido de hidrógeno.- Debido a su efecto fuertemente oxidante en la membrana lipídica y en las células proteicas (Lindgren & Dobrogosz, 1990).
- c) Producción de diacetilo.- El cual es un producto del metabolismo del citrato, y se cree que actúa interfiriendo con la utilización de la arginina (Jay, 1986).
- d) Formación de CO₂ durante la fermentación heteroláctica.- Crea un ambiente anaeróbico y tóxico para algunos microorganismos debido a su acción en las membranas celulares y a su capacidad de reducir el pH interno y externo (De Vuyst & Vandamme et al, 1994 a).
- e) Bacteriocinas.- Productos extracelulares primarios o modificados de la síntesis ribosomal bacteriana (Jack, 1995). Su sitio de acción es la membrana citoplasmática, y debido a la barrera de lipopolisacáridos de la que están provistos los microorganismos Gram negativo, generalmente solo son activos contra Gram + (Ray, 1993; Abee 1995). La ventaja que presentan las bacteriocinas con respecto a los clásicos antibióticos es la

de poder ser destruidas fácilmente por las enzimas digestivas (Caplice & Fitzgerald et al, 1999).

ALIMENTOS FERMENTADOS MEXICANOS DE MAÍZ

Debido a su composición, el maíz resulta un buen sustrato para el desarrollo de microorganismos, por lo que su fermentación es un procedimiento muy popular en diversas partes del mundo y particularmente en nuestro país, donde existe una gran variedad de alimentos fermentados de maíz, en especial, de bebidas tanto alcohólicas como refrescantes cuyo consumo es habitual entre la población de las distintas regiones de México (Tabla II).

Tabla II. Algunos alimentos fermentados mexicanos de maíz ^a

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ESTADOS DONDE SE CONSUME
Agua agria (a)	Bebida no embriagante preparada con maíz molido, mezclada con agua y fermentado.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.
Atole (a) (del azteca atl, agua; olli, líquido viscoso o hule (e, f))	Bebida no embriagante preparada con masa de maíz o tortillas y mazorcas.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Atole agrio (a, d)	Bebida no embriagante preparada con maíz negro hecho masa y fermentado durante 4 o 5 días.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Pozol (a, d) (del azteca pozolli, espumoso (g))	Bebida ácida no embriagante, preparada diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado.	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Quintana Roo.
Sendechó (a)	Bebida alcohólica (especie de cerveza), preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con "chiles colorados". La harina se mezcla con agua para formar un atole, que se hierva, se cuele, se enfría, se le añade el fermento y se deja fermentar. El fermento se prepara a partir de un sendechó anterior.	Estado de México.

Tepache (a) (del azteca tepiatl, bebida de maíz (f))	Bebida no alcohólica preparada con granos de maíz y piloncillo o panela, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua.	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.
Tegüino (a) (del azteca tecuín, latir del corazón (f, g))	Bebida semejante a la cerveza, preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con “catalizadores”, que son fragmentos de plantas existentes en la región donde se elabora.	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco.
Tamal agrio (b, d) (del azteca tamalli, etimología desconocida) (e, f)	Tamales elaborados con masa fermentada durante aproximadamente 20 horas. El xokotamal, que contiene únicamente masa y el etixtamal, que contiene frijol negro se envuelven en hojas de maíz y el xokotamal piksa se cocina con frijol gordo tierno y se envuelve en hoja de moxte.	Puebla: Cuetzalan.
Tortilla agria (c, d)	Se cuece el maíz con cal y se deja toda la noche sobre la candela. Ya frío se lava y se muele. La masa se reposa medio día y con la masa aceda se hacen tortillas.	Quintana Roo, Yucatán.

^aDatos recopilados por Wachter (1995).

- (a) De Cruz Ulloa y Ulloa, 1973
- (b) De Valderrama y Ramírez, 1993
- (c) De Nieto y Vázquez, 1993
- (d) Escamilla y col., 1991
- (e) Robelo, 1904
- (f) Santamaría, 1978
- (g) Robelo, 1948

EL MAÍZ

El maíz (*Zea mays L*) es el cereal de mayor consumo en México y en general en todo el continente americano del cual es originario.

COMPOSICIÓN DEL MAÍZ:

Los carbohidratos del maíz están distribuidos entre muchos tejidos del grano. El carbohidrato más abundante del grano es el almidón y constituye entre el 61-78% de su peso seco. El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa llamados amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida por largas cadenas lineales con 200-2500 unidades, y pesos moleculares hasta de un millón de daltons unidas por enlaces α -(1-4) glucosídicos. En cambio, la amilopectina tiene un peso molecular muy alto, ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltons, las cuales se encuentran unidas por enlaces α -(1,4) y α -(1,6) glucosídicos. Las variedades habituales de maíz en el comercio tienen un máximo del 65% de amilosa. Las moléculas de amilosa, que son lineales y menos voluminosas que las ramificadas de amilopectina, pueden, en la fase inicial del proceso de gelatinización, difundir hacia y a través de la membrana superficial y pasar así a la solución extragranular (Fennema,1993).

Muchos polisacáridos diferentes juegan un papel importante en la estructura de los granos de maíz, éstos pueden clasificarse como sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosas. Se ha encontrado que el pericarpio de maíz está compuesto de 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina con base a peso seco.

Las pentosas xilosa y arabinosa son constituyentes muy importantes de los xilanos de la pared celular, los cuales constituyen del 90 al 95% de la hemicelulosa de la semilla de maíz. La hemicelulosa del pericarpio de maíz contiene 54% de xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucorónico (Boyer,1987).

Cravioto y col. (1955) analizaron el pozol y los granos de maíz utilizados en su preparación y encontraron que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptofano que el maíz. La concentración de proteína es mayor y ésta es de mejor calidad en el pozol que en el maíz.

Ramírez (1987) detectó un aumento en las concentraciones de lisina, triptofano y niacina después de 10 días de fermentación.

Según lo establecido por Flores Espinoza (1996), las bacterias lácticas aisladas del pozol son capaces de fermentar una gran cantidad de azúcares, incluyendo los que se encuentran en el nixtamal. Son capaces de degradar el almidón y la actividad amilolítica se ve favorecida en presencia de calcio. También se señala que dichas bacterias poseen una propiedad considerable que es la de hidrolizar un polímero de pentosas: el xilano, lo que sugiere que también podrían utilizar la hemicelulosa del maíz

NIXTAMALIZACIÓN:

El término nixtamal viene del náhuatl “nextli” cenizas de cal y “tamalli” masa de maíz; la nixtamalización es un proceso prehispánico de lixiviación del grano de maíz, precedido de un tratamiento térmico alcalino que produce importantes cambios físicos y químicos en el grano y da como resultado una masa apta para la elaboración de tortillas y otros productos tradicionales (Watson & Ramstad, 1987).

Como se muestra en la tabla III, la nixtamalización disminuye la concentración de los azúcares debido a los lavados, remojo y cocción a que se sujetan los granos de maíz. En la masa de maíz nixtamalizado, los monosacáridos glucosa y fructosa se encuentran en concentraciones bajas en comparación con las de la sacarosa y la glucosa.

Tabla III. Concentración de azúcares en granos de maíz sin tratamiento y en maíz nixtamalizado.

	% en base seca			
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa
Sin tratamiento ^a	0.2-0.5	0.1-0.4	4-8	0.4 -1
Nixtamalizado ^b	0.05	0.06	1.3	0.9

^aFuente: Boyer, 1987.

^bFuente: Flores Piña, 1998

La nixtamalización no solo trae como consecuencia la disminución de la concentración de los azúcares, sino que también disminuye la de los carbohidratos en general y las de las grasas, proteína, vitaminas y minerales debido a las pérdidas durante el remojo, el lavado y la cocción en presencia de cal (Tabla IV).

Los factores de control de la nixtamalización de maíz se encuentran a través de todo el proceso incluyendo:

- a) el perfil de tiempo-temperatura empleado durante el cocimiento y reposo
- b) el tipo de lavado de nixtamal
- c) las condiciones de molienda

COCIMIENTO Y REPOSO

El cocimiento de los granos de maíz ocurre durante el calentamiento y el enfriamiento de la mezcla de maíz, cal y agua. Existen varias alternativas de adición del grano al agua para su cocimiento que se emplean actualmente. El grano se adiciona al agua caliente o el agua se calienta con el grano adentro para después sostener la temperatura de la mezcla, eliminar la fuente de calor y entonces dejar reposar. En ocasiones, principalmente para la elaboración de productos fritos, se adiciona agua fresca a la mezcla caliente para detener el cocimiento.

El cocimiento aplicado al maíz tiene la función de hidratar el grano, suavizar el pericarpio, desnaturalizar proteínas y gelatinizar parcialmente el almidón. Estos cambios físicos y químicos aumentan en la medida que los granos son más pequeños, están más quebrados y/o fracturados, la cal es más activa y soluble, y se aplican temperaturas de aproximadamente 60-70°C por un período de tiempo mas largo. El período del reposo (o descanso) debe permitir la difusión de la humedad dentro del grano para producir granos de nixtamal hidratados homogéneamente. En estas condiciones, el nixtamal es blando y prácticamente está libre de pericarpio. Parte de la cal es absorbida principalmente en el germen del grano.

Los granos se hinchan debido al efecto combinado de la gelatinización del almidón, degradación parcial de la estructura del endospermo, degradación/solubilización parcial de la pared celular y la solubilización parcial de la matriz proteica.

LAVADO

El lavado tiene las funciones de eliminar el pericarpio ya suavizado, el exceso de cal y el agua de cocimiento o “nejayote”, y de enfriar el nixtamal dependiendo del tipo de cocimiento empleado. Se puede aplicar un mezclado o agitación mecánica para mejorar la transferencia de los materiales y aumentar la eficiencia del lavado. El lavado debe ser lo más uniforme posible y llevar el nixtamal a una temperatura aproximada de menos de 35°C con en mínimo uso de agua.

Como consecuencia del lavado el pH disminuye (hasta $\text{pH } 7.5 \pm 0.5$), se pierde materia seca, y puede mejorarse el color del producto. En ocasiones se disminuye o elimina el lavado con el propósito de conservar las gomas naturales del maíz (hemicelulosa y otras fibras solubles) y no reducir los rendimientos. Las gomas del maíz ayudan a retener el agua e imparten flexibilidad y suavidad a la masa. Por otro lado, cuando se retiene el exceso de cal existe un mayor riesgo de oscurecimiento del producto.

MOLIENDA

La molienda de nixtamal produce una masa de maíz compuesta por varios tipos de partículas que incluyen fragmentos del grano, pericarpio y germen, as como almidón, proteínas y fibras hidratadas, y grasa en mezcla con alrededor de 50-60% de humedad. La condición del nixtamal, el tipo de piedra, la separación entre las piedras y el agua adicionada son factores a controlar durante la molienda. Con la adición de agua durante la molienda, la masa resultante puede tener hasta 60% de humedad. El tamaño, el tipo y estado del labrado y la separación entre las piedras afectan el tamaño de las partículas de la masa (finas o gruesas), la eficiencia, la fricción y el calentamiento desarrollados durante la molienda. Canales profundos en el labrado producen masa más gruesa. La adición de agua durante la molienda disminuye la fricción, evita el sobrecalentamiento y produce masa más suave. El rango de temperatura de la masa fresca común cuando sale del molino es de 50-75°C. La separación entre piedras debe ser adecuada para obtener masa con la consistencia requerida. La molienda de nixtamal sobrecocido, con alto contenido de humedad, entre piedras cerradas, sin adición de agua genera exceso de calor y tiende a producir masa pegajosa que se seca rápidamente

MEZCLADO Y FORMADO DE LA MASA

Es en esta etapa donde se reflejan gran parte de los efectos del cocimiento y molienda previos. Desafortunadamente, en caso de observarse efectos indeseables, en muchos casos, es demasiado tarde para corregir las características del nixtamal o la masa (Helberdt, Almedia & Lloyd, 1997).

Tabla IV Valor nutritivo del maíz blanco (*Zea mays L*) y de la masa de maíz nixtamalizada.

	MAÍZ BLANCO	MASA DE MAÍZ BLANCO NIXTAMALIZADA
Porción comestible (%)	0.92	1.0
Humedad (%)	10.6	62.2
Fibra (g)	12.20	3.40
Energía (Kcal)	362	154
Hidratos de carbono (g)	73.0	31.8
Proteínas totales (g)	7.9	3.5
Grasas Totales (g)	4.7	1.9
Colesterol (mg)	0	0
Ácidos grasos saturados totales (g)	0.60	0.20
Ácidos grasos monoinsaturados (Oléico) (g)	1.30	0.50
Ácidos grasos poliinsaturados (Linoléico) (g)	2.50	1.00
Calcio (mg)	159	70
Hierro (mg)	2.3	1.6
Magnesio (mg)	147	---
Sodio (mg)	1	---
Potasio (mg)	284	---
Zinc (mg)	---	---
Retinol (mcg)	1	0
Ácido ascórbico (mg)	0	0
Tiamina (mg)	0.36	0.13
Riboflavina (mg)	0.06	0.04
Niacina (mg)	1.9	0.6
Piridoxina (mg)	---	---
Ácido fólico (mcg)	---	---

* En 100 g de alimento crudo en peso neto

* Valores de masa promedio

FUENTE: Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán "Tablas de uso práctico del Valor Nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México". 2ª. Edición revisada, noviembre (1992).

EL POZOL

El pozol (del náhuatl *pozolli*; espumoso) es una bebida de masa de maíz nixtamalizada y fermentada que suspendida en agua es consumida como bebida ceremonial y alimento básico por poblaciones indígenas del sureste de México, y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1976 - 1982).

MICROBIOLOGÍA DEL POZOL:

Hongos y Levaduras:

Los estudios realizados por Ulloa (1974) en muestras de pozol de Tabasco, determinaron la presencia *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida* (*Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilopsis*, *Candida tropicalis*) en pozol con pocas horas de fermentación. A medida que la superficie va perdiendo humedad y el pH va disminuyendo aparecen *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Monilia sitophila*, *Mucor rouxianus* o *Mucor racemosus*.

Las levaduras aisladas fueron *Hansenula fibirianti*, *Klyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae* mientras que los mohos detectados fueron *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum* sp, *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium lanosoviride*, *Phialophora richardsiae*. *Rhizopus nigricans* y *Trichoderma viride*.

Bacterias mesófilas no lácticas:

Salinas (1958) aisló *Bacillus cereus*. Wachter (1995) confirmó la existencia del género *Bacillus* en muestras de pozol de los Altos de Chiapas.

Enterobacterias:

Salinas (1958), detectó la presencia de *Paracolobactrum* (*Citrobacter*) *aerogenoide*. Ulloa y Herrera (1972) aislaron del pozol *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *pozolis*. Fuentes Herrera y Ulloa (1971) aislaron *Pseudomonas mexicana* y *Escherichia coli* var. *neapolitana*. En 1995, Wachter aisló *Klebsiella pneumoniae* de muestras de Tapachula, Chiapas, y *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans* y *Escherichia*

coli. En 1999, Ampe y colaboradores detectaron la presencia de las enterobacterias y determinaron que su número se incrementaba durante la preparación del pozol procedente de Tabasco.

Escamilla Hurtado (1988) detectó que después de las 48 h de fermentación, las bacterias Gram negativas prácticamente habían desaparecido mientras que las bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos) empezaban a aumentar su número después de 60 h, esto asociado a un incremento de la acidez y la concomitante disminución del pH.

Sainz Espuñes (1998) analizó muestras de pozol elaborado en pozolerías de la ciudad de Villahermosa, Tabasco y concluyó que las enterobacterias están presentes y las cuentas totales iniciales son muy altas, aunque se reducen con la fermentación, no se eliminan totalmente. Además encontró que a pesar de que hay sobrevivencia a la fermentación tanto de cepas patógenas como no patógenas, la acidificación en conjunto con el tiempo confiere seguridad en la eliminación de microorganismos como *Escherichia coli*.

Bacterias Lácticas:

Silva-Villarreal (1984) aisló *Lactobacillus brevis*, y *Lactobacillus fermentum*. Posteriormente Nuraida (1988) caracterizó bacterias de los géneros *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp y *Streptococcus* spp que fueron aisladas por Owens y Wacher en 1987 de pozoles de Chiapas. Las especies aisladas fueron *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus (Lactococcus) lactis* y *Streptococcus (Lactococcus) raffinolactis*.

En 1995, Wacher encontró bacterias lácticas homo y heterofermentativas y detectó el predominio de las heterofermentativas. También determinó que algunas de las bacterias lácticas caracterizadas poseían actividad amilolítica y confirmó la presencia de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Ampe y colaboradores (1999) determinaron que *Lactococcus* y *Leuconostoc* son los géneros dominantes a las 12 h de fermentación, mientras que después de 5 días de fermentación la proporción de bacterias lácticas era aproximadamente del 93%. Indican también que los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* son probablemente los dominantes al inicio de la fermentación mientras que *Lactobacillus* cobra importancia al final del proceso. Esto

concuenda con lo dicho por Wachter (1995) acerca de que la actividad de las cepas de *Leuconostoc* es importante para acidificar rápidamente la masa al principio de la fermentación y para producir una textura esponjosa en la masa, mientras que *Lactobacillus* permite alcanzar niveles altos de acidez.

Silva-Villarreal (1984) detectó el aumento de la acidez durante las primeras 48 h de fermentación y aisló *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* en las primeras etapas de fermentación.

Díaz (1996) estudió el metabolismo de los principales carbohidratos solubles presentes en el maíz nixtamalizado por parte de una bacteria láctica que predomina al inicio de la fermentación del pozol (*Leuconostoc* Pz 12) y señaló la importancia de la presencia de sacarosa en la masa de nixtamal para su acidificación rápida por cepas de *Leuconostoc* y concluyó que existe un efecto marcado de la presencia o ausencia del oxígeno sobre el metabolismo de la sacarosa, tal como el reportado anteriormente para la glucosa: en condiciones de aerobiosis se produce mas acetato y no se afecta la producción de lactato.

Wachter (1995) reportó que:

“Los números iniciales de bacterias lácticas en las masas son altos, al igual que los de las enterobacterias y los de los mesófilos no lácticos (*Bacillus*), cuya presencia se considera indeseable debido a la posibilidad de incluir patógenos. Ninguno de los dos grupos microbianos desaparecen de la masa aún después de 9 días de fermentación.

La fuente de inóculo más importante de todos los grupos microbianos es la molienda, con contribuciones menores del remojo, de la superficie sobre la que se amasa y del aire.

El desarrollo de las bacterias lácticas y de las enterobacterias fue similar en el interior y en la superficie de la masa, donde se supone que existe mayor aireación, pero los grupos más aerobios de mohos, levaduras y bacterias mesófilas aerobias crecieron mas en la superficie. Esto sugiere que el ataque a la masa nixtamalizada es compartimentalizado y distinto entre las zonas que lo constituyen.”

Wachter (1995) también sugirió que:

“Las bacterias lácticas no necesitan de otros microorganismos para desarrollarse favorablemente en la masa de nixtamal y que pueden desarrollarse aunque no cuenten con la capacidad de hidrolizar almidón. Ésta les confiere a las cepas de *Leuconostoc* una ventaja de crecimiento y mayor acidificación del sustrato sobre aquéllas sin este fenotipo.”

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Wacher (1995), señala que a partir del proceso de elaboración, se dan principalmente dos tipos de pozol en el Estado de Chiapas: el indígena y el mestizo. En ambos se detectaron diferencias en cuanto a las condiciones higiénicas tanto de los lugares de elaboración como de los productores en las distintas regiones visitadas (Altos de Chiapas, San Cristóbal de las Casas, Chiapa de Corzo, Tuxtla Gutiérrez, Palenque y Comitán).

En el estudio realizado por Sainz (1998) en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, se indica que el pozol se elabora y se vende en los mercados y en pozolerías ubicadas fuera de los mismos. En dicho estudio se seleccionaron muestras de pozol que se venden en los mercados y se detectó que las cuentas de enterobacterias iniciales y a las 48 h de fermentación de las masas procedentes del mercado eran diferentes entre si. Sainz (1998) también sugirió que un mayor índice de contaminación puede estar relacionado con las condiciones higiénicas de elaboración, la forma y lugar en que se expende la masa de pozol y el recorrido que realiza el productor desde su lugar de origen hasta el mercado.

Con base en lo anterior se realizó un estudio de campo en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, en el que se determinó que el proceso de elaboración de la masa de pozol en todas las pozolerías es básicamente el mismo, sin embargo, se observó que las pozolerías del interior de los mercados en general presentan condiciones higiénicas diferentes a las de las pozolerías ubicadas fuera de dichos mercados. De aquí surge la hipótesis que lleva a la realización del presente estudio: “Condiciones higiénicas de elaboración diferentes repercutirán en diferencias en microbiota, características fisicoquímicas y metabolitos generados durante la fermentación de masa de pozol”.

Debido a que la ciudad de Villahermosa, Tabasco, es una zona de consumo masivo de pozol y que la venta del mismo generalmente se realiza en locales establecidos se pretende, a la larga, poder incidir en recomendaciones para los productores.

4.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el comportamiento de la población microbiana durante la fermentación de la masa de pozol elaborada en dos condiciones higiénicas distintas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer la presencia de los siguientes grupos microbianos: bacterias lácticas, bacterias mesófilas totales, enterobacterias, hongos y levaduras durante 74 horas de fermentación de la masa de pozol.
2. Determinar si las diferencias en la higiene del proceso de elaboración de la masa de pozol repercuten en diferencias entre microbiota.
3. Evaluar las diferencias en número y tipo de microorganismos de acuerdo al grado de aireación de la masa (zonas aerobia y microaerobia de la masa).
4. Relacionar éstas diferencias con los siguientes parámetros fisicoquímicos: acidez titulable, pH y humedad.
5. Evaluar las diferencias en el metabolismo de la microbiota presente mediante la cuantificación del almidón soluble y de los siguientes productos metabólicos: glucosa, sacarosa, fructosa, ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético.
6. Determinar la existencia de actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula durante la fermentación.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Selección de lugares de muestreo

En el estudio de campo realizado, se realizó una inspección visual de diversas pozolerías de entre las cuales se eligieron las siguientes de acuerdo a las condiciones higiénicas que presentaban:

◆ Local 801 del mercado José María Pino Suárez

Ubicada dentro del mercado en un pasillo muy transitado, con poca ventilación, cercano al área de venta de animales. Las superficies, paredes y aparatos se encontraban sucios. Limpieza ocasional de los utensilios con agua. Personal sin guantes ni redes o gorras para sujetar el cabello.

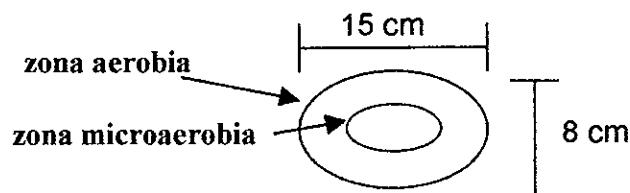
◆ Pozolería “Tabasco” ubicada en Vía Méndez # 118

Lugar poco transitado. Superficies, paredes y aparatos aparentemente limpios. Limpieza constante con desinfectante. Personal con delantales, guantes y redes para sujetar el cabello.

Descripción de las muestras

Se recolectaron 18 bolas de masa de cada pozolería inmediatamente después de terminada la molienda y formada la bola. Las muestras, que se encontraban envueltas en bolsas de plástico abiertas, se depositaron en hieleras térmicas y fueron llevadas al laboratorio donde se practicaron los análisis microbiológicos y fisicoquímicos.

Las bolas de masa pesaban aproximadamente 500 g en promedio y tenían las siguientes dimensiones:



Los muestreos se realizaron a las 2, 8, 11, 26, 50 y 74 h de fermentación de la masa y se sacrificó una bola de masa por cada muestreo. En cada hora de muestreo se congelaron 2 bolas de masa destinadas para las determinaciones de almidón soluble, actividad amilolítica y metabolitos generados de los procesos fermentativos, las cuales se realizaron en la ciudad de México.

La fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente (35°C) en las bolsas plásticas abiertas en las que fueron adquiridas las muestras.

Para la obtención de las muestras de las zonas aerobia y microaerobia de la masa, se realizó el siguiente procedimiento:

Para obtener las muestras de la zona aerobia, se separó la masa de la superficie (0.5 cm de profundidad como máximo) de la bola con guantes y espátula estériles y se homogenizó mezclando manualmente. Se tomaron muestras para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos y se procedió a realizarlos.

Posteriormente, para obtener las muestras de la zona microaerobia, la misma bola de masa se abrió por la mitad separando con ambas manos, con guantes estériles se tomó la porción central de la bola y se homogenizó manualmente. Se realizaron los análisis microbiológicos y fisicoquímicos tomando muestras de esta masa homogénea.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Preparación de la muestra:

Se tomaron muestras homogéneas de las zonas aerobia y microaerobia de cada bola de masa y se procedió de la siguiente manera con cada una:

Se pesó sobre papel aluminio estéril 1g de muestra en balanza analítica (OHAUS Analytical Plus) y se disolvió en 9 ml de peptona estéril (DIFCO 0118-01-8) al 1% contenidos en un tubo de ensaye con tapa-rosca con capacidad para 20 ml; se homogenizó en vórtex durante 5 minutos. Se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente estéril.

Cuenta viable de bacterias lácticas.

Se depositaron por duplicado 0.1 ml de las diluciones apropiadas de las muestras en cajas Petri con Agar MRS (*) y se cubrieron con una capa del mismo medio estéril. Se incubaron aeróbicamente a 35°C durante 12 h y al término de éste período se contaron directamente las colonias pequeñas blancas redondas y ovaladas. Se consideró un rango de 30-300 colonias por caja para el conteo.

Cuenta viable de bacterias mesófilas.

Se sembraron por duplicado 0.1 ml de las diluciones apropiadas sobre placas preparadas con Agar para Cuenta en Placa (ACP, *). Se incubaron a 35°C durante 12 h. Se realizaron cuentas de las colonias mayores de 1 mm de diámetro. Se consideró un rango de 30-300 colonias por caja petri.

Cuenta viable de enterobacterias.

Se inocularon por duplicado 0.1 ml de las diluciones correspondientes en cajas Petri con medio Agar Bilis Rojo Violeta con Glucosa (ABRVG, Merck 10275). Una vez solidificado el medio se cubrió con medio estéril y se incubaron a 35°C durante 12 h. Se contaron las colonias rojas rodeadas de un precipitado rojo. Se consideró un rango de 30-300 colonias por caja petri.

Cuenta viable de hongos y levaduras.

Se inocularon 0.1 ml de las diluciones correspondientes por duplicado sobre la superficie de cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD, BIOXON 119) acidificado con ácido tartárico (1.4 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10% (p/v) en 100 ml de medio esterilizado y enfriado a 50°C) y pH=3.5. Se incubaron a 35°C durante 3 días. Se consideraron las colonias mucosas, filamentosas y opacas. Se consideró un rango de 30-300 colonias por caja petri).

*Formulado según se muestra en el apéndice 1.

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Para todos los análisis se tomaron muestras de las masas homogéneas de las zonas aerobia y microaerobia de la masa como se indica al inicio de éste capítulo.

Determinación de humedad.

Se determinó el contenido de humedad por duplicado. Se pesaron 5 g de masa en balanza analítica (OHAUS Analytical Plus) sobre papel aluminio previamente pesado. La muestra se secó en estufa a 100°C hasta peso constante. Se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de peso de la siguiente forma:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso muestra seca}) \times 100}{\text{Peso muestra húmeda}}$$

Determinación de pH.

Se homogenizaron 10 g de muestra pesados en balanza analítica (OHAUS Analytical Plus) con 20 ml de agua destilada durante 1 minuto, con agitador de vidrio en un vaso de precipitado de 100 ml. Se dejó sedimentar la muestra durante 15 segundos y se determinó el pH en la fase acuosa con un pHmetro (HANNA Instruments, woonsocket, RI02895, con electrodo de vidrio)

Determinación de la acidez titulable

Se adicionaron 30 ml de agua destilada a la suspensión a la cual se le determinó el pH y se homogenizó con agitador de vidrio. Se tomaron 10 ml de la suspensión con pipeta volumétrica y se le añadieron 3 gotas de indicador de fenolftaleína, se titularon con NaOH 0.1 N hasta un

vire de color a rosa pálido. Se calculó la acidez titulable como el porcentaje de ácido láctico en la muestra húmeda de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Ácido Láctico} = \frac{(\text{ml NaOH gastados})(0.1 \text{ meq/ml})(0.9008 \text{ meq})(50 \text{ ml})}{(10 \text{ ml}) (\text{peso de la muestra seca en g})} \times 100 \text{ g}$$

CUANTIFICACIÓN DEL ALMIDÓN SOLUBLE (OTENG-GYANGK 1981)

Elaboración de la curva estándar

- Solución de almidón soluble: Se pesaron 0.2533g de almidón soluble de papa (BAKER 4006-01) y se disolvieron y aforaron a 25 ml con agua destilada. De aquí se tomó una alícuota de 1ml y se aforó a 25 ml con agua destilada. La concentración final de la solución fue de 0.40528 mg/ml.
- Solución stock de lugol: Se pesaron 3 g de KI y 0.3 g de I₂ y se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Cada vez que se hacía una determinación, se preparaba una solución fresca al 4% a partir de la solución stock diluyendo con agua destilada.

Se realizaron las diluciones correspondientes y se leyó la absorbancia a 620 nm (Espectrofotómetro Marca Baush & Lomb spectronic 21). La curva estándar y la ecuación de la recta correspondiente se encuentran en el apéndice 2.

Tratamiento de la muestra

Se tomaron muestras del centro (abriendo la masa por la mitad) y superficie (0.5 cm de profundidad como máximo mediante un raspado) de la masa.

Se pesaron 11.25 g de muestra y se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua destilada; se calentó la disolución a 60°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota

de 5 ml y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se tomó una alícuota de 0.1 ml y se le adicionaron 2.4 ml de la solución de lugol al 4%; se agitó en vórtex por 30 segundos.

Se leyó la absorbancia a 620 nm (Espectrofotómetro Marca Baush & Lomb spectronic 21) y se interpoló de la curva estándar la concentración de almidón soluble. Se calculó la concentración de almidón soluble en base seca mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Almidón soluble base seca} = \frac{(\text{valor interpolado mg/ml})(2.5 \text{ ml})(100 \text{ ml})(100 \text{ ml})(1 \text{ g})}{(0.1 \text{ ml})(5 \text{ ml})(\text{peso de muestra seca})(1000 \text{ mg})} \times 100$$

CUANTIFICACIÓN DE DISACÁRIDOS, GLUCOSA, FRUCTOSA, ÁCIDO LÁCTICO, ÁCIDO FÓRMICO Y ÁCIDO ACÉTICO POR HPLC

Elaboración de las curvas patrón

- Solución stock de sacarosa (Sigma), glucosa (Sigma), lactato de litio(Sigma), formiato de sodio (Sigma) y acetato de sodio (Sigma)(SGLFA) al 1%: Se pesaron 1 g de cada uno de los reactivos en balanza analítica (Sartorius L-2200 P) y juntos se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua desionizada. Las concentraciones finales de los analitos fueron: sacarosa 0.01g/ml, glucosa 0.01 g/ml, ácido acético 0.007317 g/ml, ácido láctico 0.00938 g/ml y ácido fórmico 0.006764 g/ml.
- Solución stock de fructosa (Sigma): Se pesaron 0.5333 g de fructosa en balanza analítica (Sartorius L-2200 P) y se disolvieron y aforaron a 50 ml con agua desionizada. La solución final tuvo una concentración de 0.0106 g/ml.

Se realizaron las diluciones correspondientes y cada una se inyectó en un cromatógrafo de líquidos programable marca Thermostepration Products, modelo Constrametric 3200, con

inyector automático marca ESA modelo 545 con loop de 50 μ L, utilizando una columna Aminex Ion Exclusión HPX-87H (Biorad Labs.) de 30 cm.

Se usó un detector de índice de refracción marca Refractomonitor Mod. IV, con un integrador marca LDC Analytical. Se utilizó un desgasificador de membrana marca SP Thermostepparation products.

La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 0.1 N filtrado con prefiltro de vidrio Millipore y papel Whatman No. 4, y se usó con un flujo de 0.6 ml/min.

Las áreas obtenidas se graficaron en el eje de las ordenadas y las concentraciones en el eje de las abscisas. Las ecuaciones de la recta obtenidas se encuentran en el apéndice 3. Los cromatogramas correspondientes a las curvas estándar se localizan en el apéndice 4.

Debido a que la columna Aminex Ion Exclusion HPX-87H (Biorad Labs.) no separa la maltosa de la sacarosa, no pudieron diferenciarse estos disacáridos, por lo que se cuantificó la mezcla de ambos.

Procedimiento de extracción y clarificación de las muestras

El proceso de extracción y clarificación de las muestras se realizó con base al método desarrollado por Santillana (1995). Las muestras procesadas fueron tomadas del centro (abriendo la masa por la mitad) y de la superficie (0.5 cm de profundidad como máximo mediante un raspado) de la masa. El procedimiento realizado fue el siguiente:

Se pesaron 5 g de masa en balanza analítica (Sartorius L-200 P) y se disolvieron en 20 ml de agua desionizada a 65°C. Se mezcló a velocidad media en ultraturrax por 5 min y se centrifugó (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) a 15000 rpm durante 15 min a 4°C (tubos Beckman JA-17). Se separó el sobrenadante y se aforó a 25 ml en matraz volumétrico. Ésta disolución se congeló durante 4 días a -20°C; transcurrido este tiempo se tomó una alícuota y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente en microcentrífuga (Du Pont Lstrgent G5). Se filtró el sobrenadante con prefiltro (Millipore AP2501000) y membrana de 0.45 μ m (Millipore HVLP01300). Nuevamente se congeló la muestra durante 4 días a -20°C. Después de este período se centrifugó a 15000 rpm durante

30 minutos a temperatura ambiente en microcentrífuga. Se tomó el sobrenadante y se filtro con prefiltro y membrana de 0.45 μm obteniéndose una muestra clara lista para ser inyectada en el HPLC.

Se calculó el porcentaje de los metabolitos en la muestra seca de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{metabolito} = (\text{valor interpolado de la curva g/L}) (1\text{L}/1000 \text{ ml})(25 \text{ ml/ g de muestra seca}) \times 100$$

g de masa seca

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA EXTRACELULAR Y ASOCIADA A LA CÉLULA

Obtención de la muestra liofilizada:

Se disolvieron 150g de masa en 250 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH=7 mediante agitación constante con magneto durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugo (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) a 15,000 rpm durante 5 minutos a 0°C y se separó el sobrenadante el cual se congeló inmediatamente con una mezcla de hielo seco-acetona y se procedió a liofilizarlo (Liofilizadora marca Labconco Mod. Freezer Dry System). Las muestras liofilizadas se mantuvieron en congelación a -4°C en bolsas plásticas con cierre hermético.

Cuantificación de la proteína total por el método de Lowry modificado (Peterson G. L. 1977)

Elaboración de la curva patrón:

- Solución stock de albúmina (Albúmina bovina con 98-99% de albúmina, 15.8% Nitrógeno, marca SIGMA): se pesaron 0.0258g de albúmina y se llevaron a 25 ml en matraz aforado con agua destilada. De aquí se tomaron 2.5 ml y se aforaron a 25 ml con agua destilada. La concentración final de la solución stock de albúmina fue de 0.1032 mg/ml.
- Solución A: Mezcla de volúmenes iguales de solución de CTC (Carbonato de sodio (MERCK) al 10%, tartrato de potasio(BAKER) al 0.2% y sulfato de cobre.5 H₂O (BAKER) al 0.1%), NaOH (BAKER) 0.8N y SDS (SIGMA) al 10%. Esta solución se preparaba antes de iniciar la técnica.
- Solución B: Dilución 1:6 del Reactivo Folin-Ciocalteu-Fenol (SIGMA) con agua destilada preparada momentos antes de desarrollar la determinación.

Se realizaron las diluciones correspondientes en el intervalo de 0 – 37.152 µg proteína / ml y se llevó a cabo la reacción como se describe posteriormente. Se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda Bio 4335).

La curva patrón correspondiente así como la ecuación de la recta se muestran en el apéndice 5.

Cuantificación de la proteína total en las muestras:

Se pesó 1 g de muestra y se disolvió y aforó con agua destilada a 10 ml. Se mezcló con 10 ml de TCA (BAKER) al 10% y se homogenizó en vórtex durante 15 minutos en un tubo plástico para centrifuga (JA 20.1). Se congeló por 12 h para lograr una mejor precipitación de las proteínas. Se dejó descongelar a temperatura ambiente y se separó la pastilla por centrifugación (Beckmann Modelo J2-MC) a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendió en 10 ml de NaOH 0.1N homogenizando en vórtex durante 15 min. De aquí se

tomó una alícuota de 0.1 ml y se llevó a 10 ml con agua destilada en matríz aforado. A ésta solución problema final se aplicó la siguiente técnica por triplicado: Se tomó 1 ml de dicha solución y con agitación continua (Vórtex) se le agregó 1 ml de la solución A. Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo se agregaron 0.5 ml de la solución B con agitación continua. Se dejó desarrollar la reacción durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 750 nm.

Se calculó el contenido de proteína total en las muestras de la siguiente forma:

$$\frac{\text{g proteína total}}{\text{g muestra liofilizada}} = \frac{(\text{valor interpolado } \mu\text{g})(2.5 \text{ ml})(10 \text{ ml})(\frac{10 \text{ ml}}{1 \text{ ml}})(\frac{1 \text{ g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}})}{(1 \text{ ml})(0.1 \text{ ml})(\text{g muestra liofilizada})(1 \times 10^6 \mu\text{g})}$$

Determinación de la actividad amilolítica

Elaboración de la curva patrón de azúcares reductores:

- Solución stock de glucosa (Baker 1916-01): Se pesaron 0.0500 g de glucosa y se aforaron con agua destilada en matraz aforado a 50 ml. La concentración final de ésta solución fue de 1 mg/ml.
- Solución de DNS: NaOH (BAKER) al 1.4%, DNS (SIGMA) al 0.75%, tartrato doble de sodio y potasio (BAKER) al 21.6%, fenol (BAKER) al 0.56% y metabisulfito de sodio (BAKER) al 0.59%. Todos los reactivos se disolvieron en agua destilada.

Se realizaron las diluciones correspondientes en el intervalo de 0 – 0.175 mg glucosa/ml, se realizó la reacción como se explica posteriormente y se leyó la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda Bio 4335).

La curva patrón y ecuación de la recta se muestran en el apéndice 5.

Determinación de la actividad amilolítica en las muestras:

Se pesaron y aforaron 0.25 g de muestra a 2.5 ml con solución inhibidora de proteasas (Complete # 1697498, marca Boehringer Mannheim). Se homogenizó en vórtex durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó (Beckmann Modelo J2-MC) a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separaron el sobrenadante y el precipitado y se realizaron los siguientes procedimientos:

- **Determinación de la actividad amilolítica extracelular:** Se tomaron 0.5 ml de sobrenadante (por cuadruplicado) y tres de ellas se colocaron en tubos con 0.5 ml de buffer de citratos 0.15 M pH=5 y 0.5 ml de solución de almidón (BAKER 4006-01) al 1%, la cuarta alícuota se adicionó a un tubo que además de las soluciones antes mencionadas contenía 2 ml de solución de DNS (Blanco). Se procedió a la incubación y reacción como se indica mas adelante.
- **Determinación de la actividad amilolítica asociada a la célula:** Se resuspendió el precipitado en 2 ml de solución inhibidora de proteasas y se tomaron 0.5 ml (por cuadruplicado) de ésta suspensión. Tres de ellas se colocaron en tubos con 0.5 ml de buffer de citratos 0.15 M pH=5 y 0.5 ml de solución de almidón (BAKER 4006-01) al 1%, la cuarta alícuota se adicionó a un tubo que además de las soluciones antes mencionadas contenía 2 ml de solución de DNS (Blanco).

Incubación y reacción:

Los tubos se incubaron en baño de agua a 35°C durante 4 horas. Inmediatamente después se adicionaron 2 ml de solución de DNS a todos los tubos excepto al blanco y se sometieron a baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Perkin Elmer Modelo Lambda Bio 4335) a 540 nm.

- Se calculó la actividad amilolítica extracelular como la cantidad de azúcares reductores producidos por gramo de proteína total de la siguiente forma:

$$\frac{\text{mg azúcares reductores}}{\text{g muestra liofilizada}} = \frac{(\text{valor interpolado mg})(2.5 \text{ ml})(\underline{\quad 2.5 \text{ ml} \quad})}{\text{ml} \quad (0.5 \text{ ml})(\text{g muestra liofilizada})}$$

$$\frac{\text{mg azúcares reductores}}{\text{g proteína total}} = \frac{(\text{mg azúcares reductores} / \text{g muestra liofilizada})}{(\text{g proteína total} / \text{g muestra liofilizada})}$$

- Se calculó la actividad amilolítica asociada a la célula como la cantidad de azúcares reductores producidos por gramo de proteína total de la siguiente forma:

$$\frac{\text{mg azúcares reductores}}{\text{g muestra liofilizada}} = \frac{(\text{valor interpolado mg})(2.5 \text{ ml})(\underline{\quad 2 \text{ ml} \quad})}{\text{ml} \quad (0.5 \text{ ml})(\text{g muestra liofilizada})}$$

$$\frac{\text{mg azúcares reductores}}{\text{g proteína total}} = \frac{(\text{mg azúcares reductores} / \text{g muestra liofilizada})}{(\text{g proteína total} / \text{g muestra liofilizada})}$$

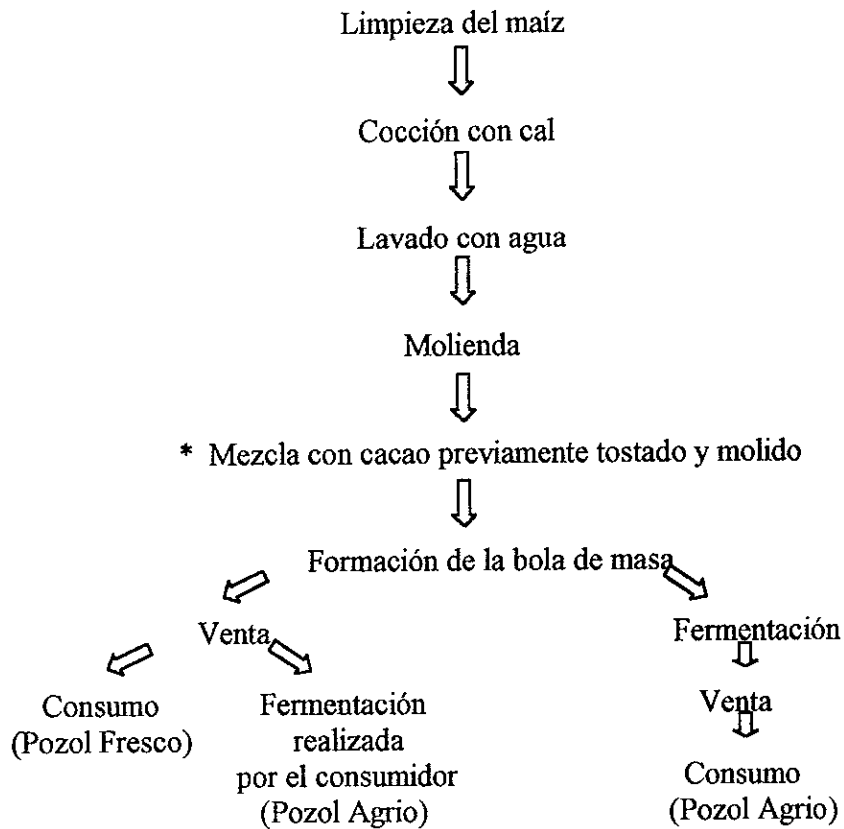
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de Campo

Se realizó un estudio de campo en la ciudad de Villahermosa, Tabasco con la finalidad de conocer el proceso local de elaboración del pozol, así como también los diferentes tipos de pozolerías que existen en dicho lugar con el fin de seleccionar las mas adecuadas para obtener de ellas las muestras para el presente estudio. En el caso particular del estado de Tabasco, el pozol goza de gran popularidad entre sus habitantes y su consumo es un hábito muy arraigado entre la población. Se acuerdo a la información proporcionada por productores de masa de pozol, un adulto consume en promedio entre medio y un litro de la bebida diariamente.

Existen 2 tipos de pozol: el pozol blanco y el de cacao o “chorote”, para el cual el cacao se tuesta y muele hasta que suelte la grasa para después ser incorporado a la masa de maíz. En algunas regiones se prepara pozol con pixte, que es la semilla del zapote colorado previamente secada, tostada y molida o con pataste que es una variedad del cacao. La masa se bate con agua y azúcar al gusto para servirse. El proceso general de elaboración de la masa de pozol se muestra en la figura 2.

El pozol se consume en diferentes estados de fermentación. Estos pueden ir desde el inicio de la misma hasta períodos de 3 días e incluso hasta de 15 días o más, dependiendo del gusto del consumidor. El responsable del grado de fermentación en el que se encuentre el pozol al momento de ser ingerido es, en la mayoría de los casos, el mismo consumidor, ya que tras adquirirlo lo envuelve en hojas de plátano o en bolsas de plástico y lo deja fermentando a temperatura ambiente (la cual varía de los 30 a los 40°C dependiendo de la época) el tiempo que desee. El pozol también se consume licuado con diversos ingredientes como lo son la leche, la horchata, el azúcar y el rompope.



* Para la elaboración de pozol de cacao o “chorote”

Figura 2. Diagrama de elaboración de masa de pozol

En Villahermosa se pueden encontrar 2 tipos de pozolerías: las que se encuentran en los mercados y las que se encuentran en locales establecidos en diversas zonas de la ciudad. El proceso de elaboración del pozol en todas éstas pozolerías es básicamente el mismo. Sin embargo, existen algunos aspectos del mismo en los que se encuentran pequeñas variantes. Existe además las pozolerías rurales que se localizan en las afueras de las ciudades.

Algunas de las diferencias que se pueden apreciar en los procesos empleados en las diferentes pozolerías son:

- Cocción del maíz: En las pozolerías ubicadas fuera del mercado la cocción se lleva a cabo en grandes ollas de cobre con leña de un árbol llamado “tinto” (la cual, según el productor, tiene la característica de que al quemarse casi no produce humo y confiere un sabor muy agradable al producto) mientras que en las pozolerías de los mercados se cuecen en botes o recipientes de aluminio en cantidades menores. En el caso de las pozolerías de zonas rurales, las ollas son de barro y las cantidades de maíz son mucho menores.
- Molienda: Ésta se realiza en molinos manuales y con motor siendo los primeros los más utilizados, sin embargo, el uso del metate sigue siendo muy común en las zonas rurales.
- Fermentación: Esta etapa, como se dijo anteriormente depende en la mayoría de los casos del consumidor. Sin embargo, la masa que es fermentada por los productores del mercado se deja al aire libre o envuelta en plástico y a temperatura ambiente. En el caso de algunas pozolerías de la ciudad la masa es depositada en recipientes de plástico cerrados, mientras que la elaborada en las zonas rurales es fermentada envuelta en tela o en hojas de plátano.

En lo referente a las condiciones higiénicas existen diferencias básicamente en los siguientes aspectos:

- Limpieza del lugar de elaboración: Las pozolerías que se localizan dentro de un mercado presentan paredes, pisos y utensilios de trabajo sucios, mientras que las localizadas en el exterior del mercado dan un aspecto de mayor limpieza.
- Agua utilizada en el lavado de los granos y en la formación de la bola de masa: mientras que en las pozolerías del mercado se utiliza el agua corriente que sale de la llave, en las de fuera del mercado utilizan agua filtrada o de garrafón , principalmente en el último lavado y en el amasado.
- Exposición a corrientes de aire: Las pozolerías de dentro del mercado se encuentran expuestas a muchas corrientes de aire las cuales podrían ser fuente de contaminación e incluso muchas de ellas están cercanas a zonas donde se expenden animales. A diferencia de éstas, las ubicadas fuera del mercado son generalmente locales cerrados, menos expuestos a corrientes de aire.
- Utilización de redes para el cabello y guantes: estas medidas se llevan a cabo en algunas pozolerías de fuera del mercado y en ninguna de las ubicadas dentro del mismo.

Las pozolerías de zonas rurales en general son las cocinas mismas de los productores, las cuales en la mayoría de los casos están expuestas a varias fuentes de contaminación, las corrientes de aire las más importantes. En la mayoría de los casos utilizan agua de pozo.

Tabla V. Cuadro comparativo de las condiciones higiénicas de las pozolerías ubicadas en la ciudad de Villahermosa, Tabasco de las cuales se obtuvieron las muestras analizadas en el presente estudio.

	Pozolería del Interior del Mercado	Pozolería del Exterior del Mercado
Limpieza del lugar	Pisos, paredes, techos y superficies sucios, molino y báscula con restos de masa seca.	Pisos, paredes y techos limpios, superficies de trabajo que se limpiaban constantemente, molino y báscula limpios.
Agua utilizada en el lavado de los granos y en la formación de la bola de masa	Procedente de la llave	Garrafón plástico
Exposición a corrientes de aire	Local ubicado a aprox. 10 m de la zona de venta de animales, con muchas entradas de aire al rededor	Local semicerrado ubicado en una avenida con poco tráfico vehicular
Utilización de redes para el cabello y guantes por parte del personal	No	Si



Fig. 3 Pozolería ubicada fuera de mercado (FMKD)

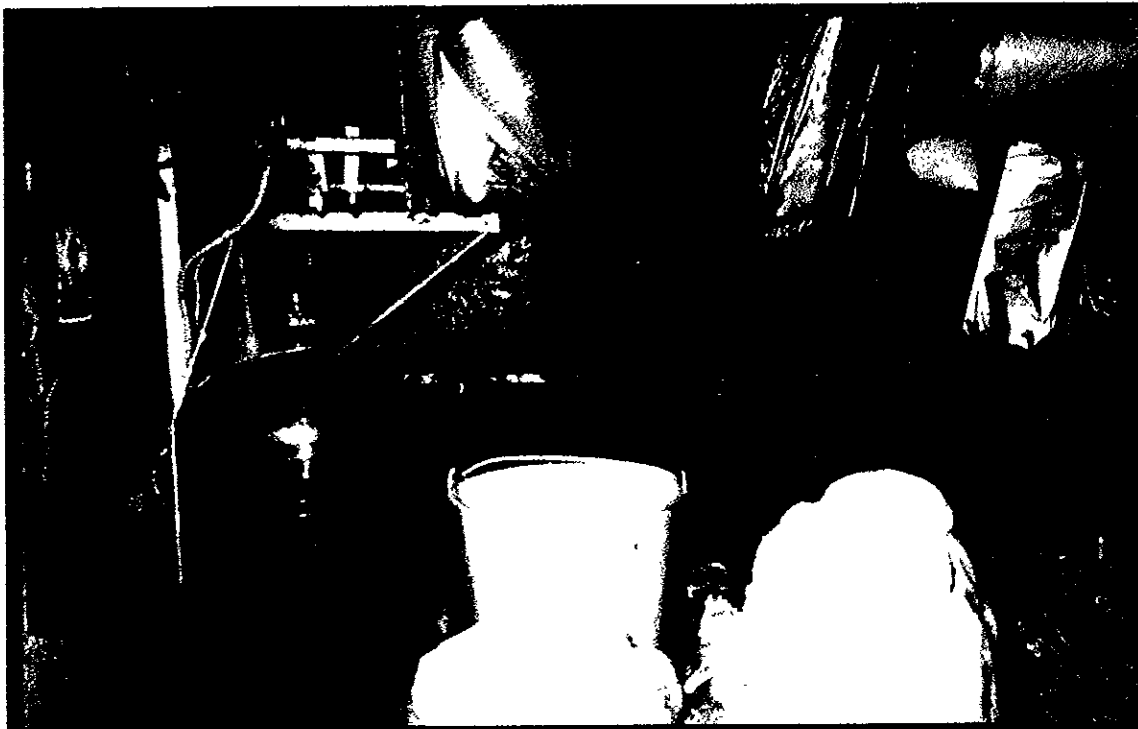


Fig. 4 Pozolería ubicada dentro de un mercado de Villahermosa, Tabasco (MKD)

Análisis microbiológico:

Comportamiento de las bacterias lácticas durante la fermentación de la masa de pozol.

En la figura 5 se observa el comportamiento de la flora láctica. La cuenta inicial de la misma fue ligeramente mayor que las de bacterias mesófilas y de enterobacterias. La mayor velocidad* de crecimiento se registró durante las primeras 26 horas ($m= 0.44 \log \text{ UFC/hora}$, $r=0.98$), tras lo cual la velocidad disminuyó ($m=0.0153$, $r=0.99$). En el caso de la masa de la pozolería ubicada dentro del mercado (MKD) no se observaron diferencias en el crecimiento de las bacterias lácticas entre las zonas aerobia y microaerobia de la masa. En contraste, en la masa elaborada fuera del mercado(FMKD), al final de la fermentación las de la zona microaerobia siguieron creciendo hasta alcanzar a las 74 h un número significativamente mayor que las que se encontraban en el interior de la masa, cuyo crecimiento se detuvo varias horas antes.

Comportamiento de las bacterias mesófilas durante la fermentación de la masa de pozol.

Las bacterias mesófilas presentaron un comportamiento similar al de las lácticas. A partir de las 11 horas no se observó diferencia entre las cuentas de estos dos grupos debido a que existe la posibilidad de que un porcentaje de bacterias cuantificadas como mesófilas corresponda a lácticas. Aunado a esto, se sabe que muchas bacterias lácticas son mesófilas y aerotolerantes. La composición de los medios de cultivo utilizados también es similar, ya que todos los componentes del medio ACP se encuentran en el medio MRS (el casitone, al ser caseína digerida por pancreatina, sustituiría a la peptona y al polvo Lab-Lemco como fuente de nitrógeno). La principal diferencia radica en la concentración de glucosa, en la presencia de las sales en el medio MRS y en el valor mas bajo de pH, por lo que éstas serían las posibles limitantes del crecimiento de las lácticas en ACP.

En las primeras 26 horas se presentó la mayor velocidad de crecimiento para el grupo de mesófilas ($m=0.75 \log \text{ UFC/hora}$, $r=0.96$), que además fue mayor a la velocidad que presentaron las bacterias lácticas en este período de la fermentación. De las 50 horas en

adelante disminuyeron su velocidad* de crecimiento ($m=0.0149$, $r=0.99$) y fue prácticamente la misma que presentaron las lácticas hasta el final de la fermentación (Figura 6). No se observó diferencia en el comportamiento de las bacterias mesófilas de ambas muestras (MKD y FMKD), excepto a las 74 h, cuando se observó un mayor crecimiento en la zona microerobia de la masa de FMKD, al igual que ocurrió con las bacterias lácticas.

* Velocidad promedio = (cuenta MKD/micro + cuenta MKD/aero + cuenta FMKD/micro + cuenta FMKD/aero) / 4

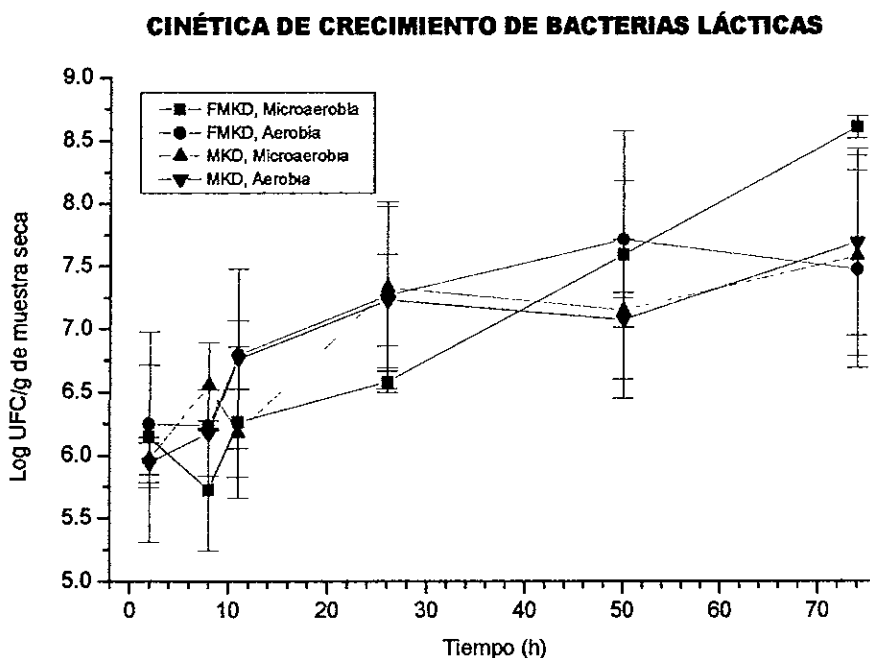


Figura 5 Crecimiento de bacterias lácticas evaluado en Agar MRS.
Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras.

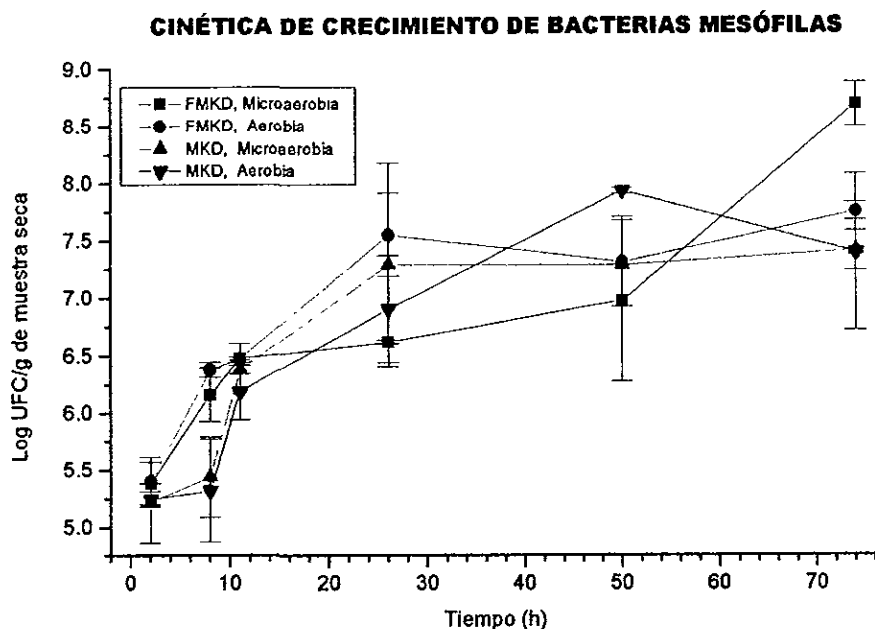


Figura 6. Crecimiento de bacterias mesófilas evaluado en Agar para Cuenta en Placa (ACP). Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras

Comportamiento de las enterobacterias durante la fermentación de la masa de pozol.

La población de enterobacterias disminuyó durante las primeras 26 h de fermentación y a partir de este momento las cuentas se mantuvieron constantes hasta las 74 horas (Figura 7), excepto en la zona aerobia de la masa MKD donde se observó una disminución de la población entre las 50 y 74 h de fermentación. Todas las cuentas llegaron a valores semejantes al final de la fermentación. Esta disminución concuerda con lo encontrado por Mensah y col. (1990), quienes señalan una reducción de la población de bacterias G- en muestras de maíz fermentadas. Wachter (1995) observó una disminución de la población de enterobacterias en muestras de masa de pozol fermentada proveniente de Chiapas durante las primeras 72 h de muestreo. El descenso de la población de enterobacterias pudo ser debido a la disminución del pH y al aumento de la acidez de la masa, producidos por la actividad metabólica de bacterias lácticas, así como a la producción de sustancias inhibitoras como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y antibióticos (Law y Kalstad, 1983) por parte de la flora láctica. La no desaparición de las enterobacterias pudo deberse a la presencia de cepas

acidorresistentes como las reportadas por Sainz (1998), quien detectó sobrevivencia de enterobacterias a valores de pH por debajo de 4 después de 48 h de fermentación en muestras de masa de pozol procedentes de Villahermosa, Tabasco. También en muestras de masa de pozol de Villahermosa, Tabasco, Ampe (1999) registró la presencia de enterobacterias en masas con 5 días de fermentación.

No se detectaron diferencias en comportamiento y niveles de la población microbiana entre las zonas aerobia y microerobia de la masa FMKD. En el caso de la masa MKD, las poblaciones de ambas zonas se comportaron de la misma manera durante las primeras 8 h de fermentación. A partir de este momento, el crecimiento en la zona aerobia fue mayor, lo que sugiere la presencia de un porcentaje mayor de cepas acidorresistentes en esta zona hasta las 50 h. El hecho de que no haya habido diferencia en las cuentas iniciales de las masas MKD y FMKD sugiere que la diferencia no radica en el número, sino en las características particulares del grupo de enterobacterias en cada masa.

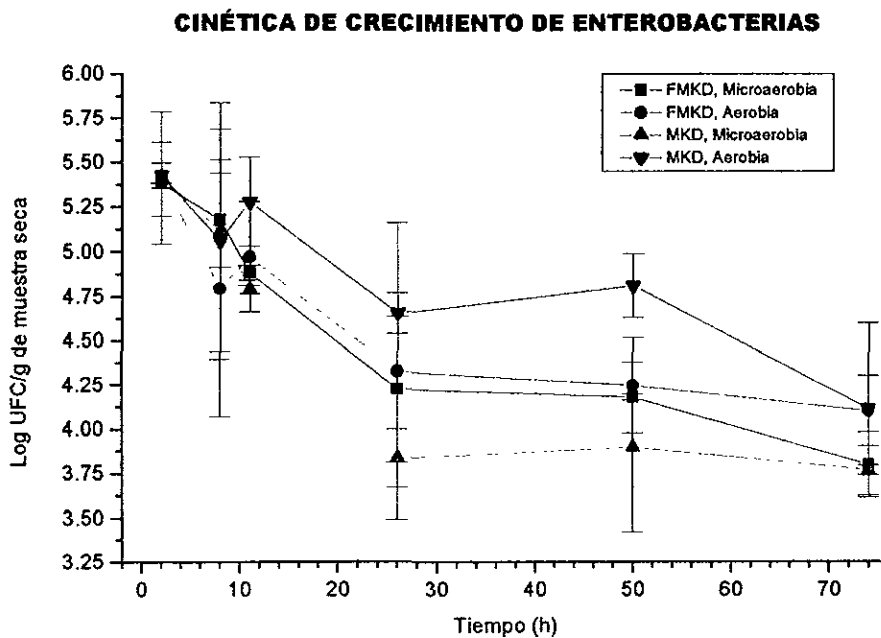


Figura 7 Crecimiento de enterobacterias evaluado en Agar Bilis Rojo Violeta con Glucosa. Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras.

Los hongos y levaduras (Tabla VI) incrementaron en número al cabo de las 72 h de fermentación. No se observaron diferencias entre las dos muestras ni entre las zonas aerobia y microaerobia de la masa. Tampoco se encontraron diferencias entre las cuentas de las muestras MKD y FMKD, lo que plantea la posibilidad de que las diferencias radiquen en las características de los integrantes del grupo en cada muestra.

Contra lo que se esperaba, no se detectó predominio de levaduras y hongos en alguna de las zonas de las masas, lo que se debió probablemente a que la heterogeneidad de las mismas permitió la existencia de canales y zonas con alto grado de aireación, incluso en la parte interna de las masas, por lo que ningún grupo logra predominar.

Tabla VI Crecimiento de hongos y levaduras en Agar APD.

Los valores presentados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras.

Tiempo (h)	Log UFC/g de muestra seca			
	MKD/micro	MKD/aero	FMKD/micro	FMKD/aero
2	2.9	2.9	3	3
74	6.7	6.9	6.6	7

El comportamiento general de la microbiota de estas muestras de Tabasco coincide con el reportado por la Dra. Wachter para muestras de masa de pozol procedentes de Chiapas, lo que indica que no hay una variación considerable en los grupos microbianos participantes en la fermentación con respecto a la zona geográfica de elaboración.

Análisis fisicoquímicos:

a) Humedad

La humedad que se encontró en la masa FMKD fue mayor que en la muestra MKD y se mantuvo así durante todo el tiempo de muestreo de la fermentación. En esta muestra la humedad se mantuvo constante a partir de las 11 h (Figura 8), mientras que en la proveniente de la masa MKD se presentó una disminución a partir del mismo momento. Esta diferencia en el comportamiento de la humedad de las dos muestras pudo deberse a la influencia del tamaño del grano en la pérdida de agua. La masa elaborada dentro del mercado (MKD) presentó una apariencia más homogénea, con pequeños fragmentos de maíz que se integraban a la masa. La elaborada fuera del mercado (FMKD) contaba con fragmentos de grano más grandes y con mayor dureza.

Cuando se compara el comportamiento de este parámetro en las zonas aerobia y anaerobia se encuentra que en la masa MKD inicialmente la humedad fue mayor en la zona aerobia de la masa, pero a partir de las 26 h esta zona de la masa fue la que presentó menor porcentaje de humedad debido al efecto de la desecación causada por el aire. En la masa FMKD los valores fueron menores en la zona aerobia durante las primeras 24 h pero al final no se observó diferencia entre ambas zonas de la masa.

El incremento en humedad registrado en las primeras horas de fermentación en los dos tipos de muestra puede tener varias causas. Entre ellas, la presencia de una mayor cantidad de compuestos volátiles (ácido acético, fórmico, etc.) durante las primeras horas, por lo que al secar las muestras se evaporaron junto con el agua. Otra posibilidad serían los cambios en la humedad ambiental, la cual era muy alta y variable en la zona de incubación de las muestras.

b) pH

El pH inicial promedio de la masa MKD (7.72) fue mayor que el de la masa FMKD (7.30), lo que pudo deberse a un lavado menos eficiente del nixtamal para remover el hidróxido de

calcio remanente. Los valores de pH de la masa MKD disminuyeron mas rápidamente que los de la masa FMKD a pesar de que la concentración inicial de sustratos fermentables, como disacáridos, glucosa y fructosa, fue menor en esta masa que en la FMKD (Figura 9). Sin embargo, como se dijo anteriormente, el aspecto de la masa MKD indica que sufrió una molienda mas severa, ya que los granos de maíz estaban mas fragmentados, por lo que el almidón posiblemente estaba mas accesible para los microorganismos, los que crecerían a expensas de esta fuente de carbono y explicaría los resultados mostrados en la gráfica de consumo de almidón soluble (Figura 19), en la que se aprecian diferencias claras en consumo del polímero entre los dos tipos de masa, independientemente de las condiciones de aerobiosis.

La disminución del pH fue gradual en el caso de la masa FMKD aunque a partir de las 50 h se observó un ligero incremento. El pH promedio final de ambas masas es prácticamente el mismo (MKD=4.15, FMKD=4.13). Los valores de pH tanto iniciales como finales son muy similares a los reportados por Sainz (1998) para muestras de masa de pozolerías ubicadas en la ciudad de Villahermosa y en la ciudad de Nacajuca, ambas en el Estado de Tabasco, quien reportó 7.15 como pH inicial y 4.1 a las 48 h.

En la masa elaborada dentro del mercado no se observó diferencia entre los valores de pH de las zonas aerobia y microaerobia. En la masa FMKD, la zona aerobia presentó durante todo el tiempo de muestreo de la fermentación un pH ligeramente mayor que el de la zona microaerobia.

c) Acidez titulable

El comportamiento de la acidez titulable es el mismo en todas las muestras durante 50 h de fermentación. La mayor velocidad de acidificación se presentó durante las primeras 11 h de fermentación (Figura 10). En la masa MKD se observó una mayor acidez titulable en la zona microaerobia entre las 11 y 32 h aprox. A partir de este momento la zona aerobia presentó porcentajes de acidez mayores. En la masa FMKD se tuvo el mismo comportamiento: la zona microaerobia registró valores mas altos de acidez titulable entre las 11 y 50 h. y después de este período la zona aerobia alcanzó valores de acidez titulable ligeramente mayores. En ambas muestras (MKD y FMKD) al inicio de la fermentación la acidez fue mayor en la zona

CAMBIOS EN LOS VALORES DE HUMEDAD DURANTE LA FERMENTACIÓN

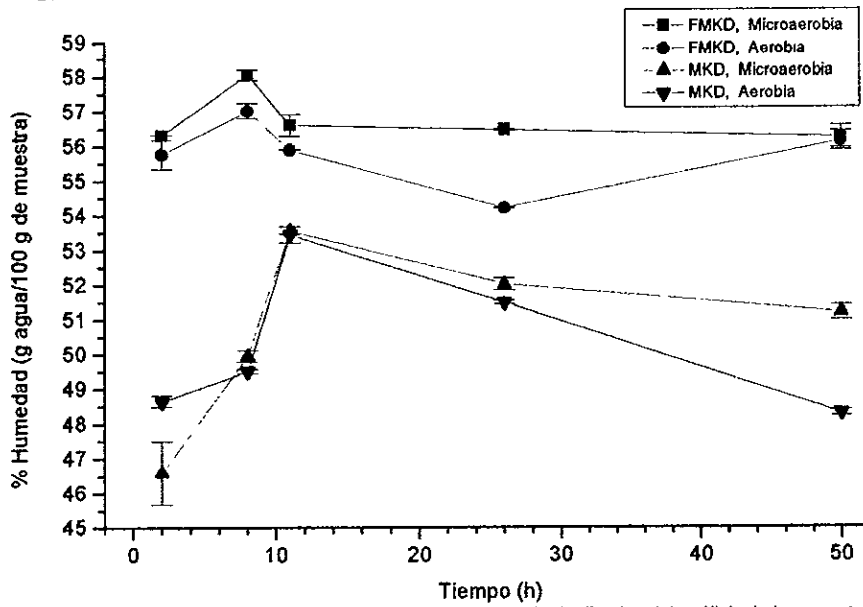


Figura 8. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de las muestras.

CAMBIOS EN LOS VALORES DE pH DURANTE LA FERMENTACIÓN

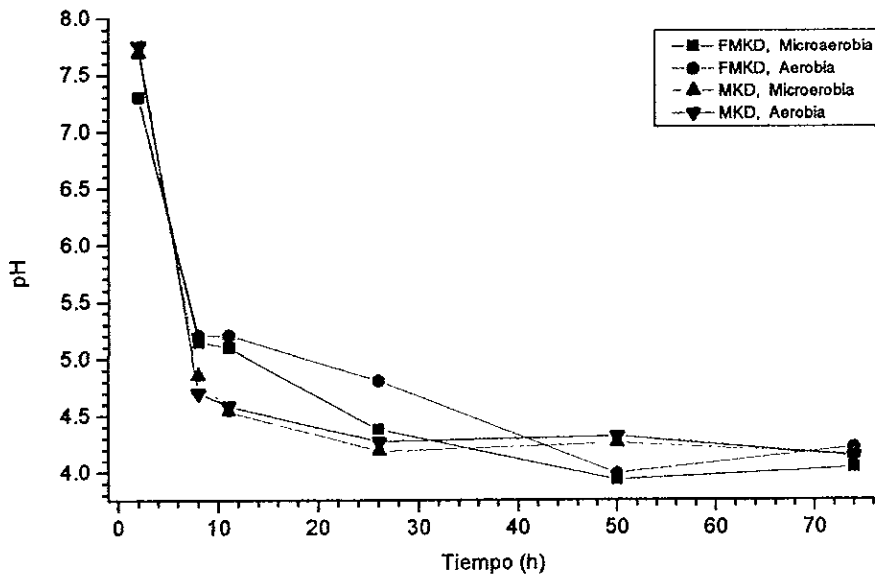


Figura 9. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de las muestras.

microaerobia y al final en la zona aerobia. Este comportamiento puede ser debido a una sustitución de bacterias homofermentadoras presentes en las primeras fases de la fermentación por otros grupos. El aumento de la acidez al final de la fermentación en la zona aerobia de la masa MKD no se refleja en los valores de pH (Figura 11), lo que podría deberse a un efecto amortiguador de otros compuestos presentes en el medio, como podrían ser los productos de un metabolismo proteolítico con péptidos con grupos amino libres resultantes o incluso a un remanente del hidróxido de calcio de la nixtamalización.

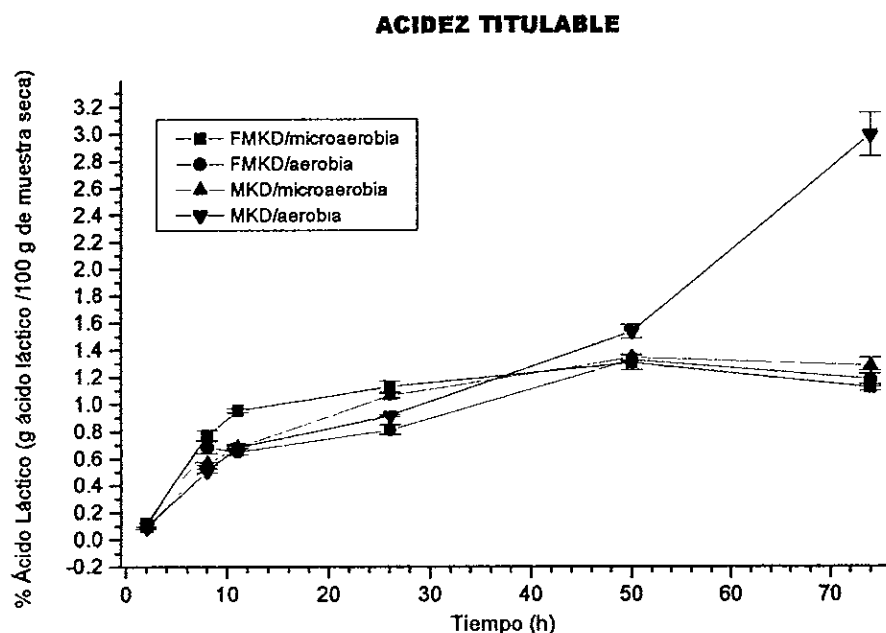


Fig. 10 Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras

Al analizar la relación de la cinética de crecimiento de los grupos microbianos con la acidez titulable y el pH se observó una relación directa entre el crecimiento de las bacterias lácticas y el aumento de la acidez durante las primeras 50 horas (Figura 12). Este comportamiento es congruente con el hecho de que la producción de ácido láctico está íntimamente relacionada con el crecimiento de estas bacterias. A partir de las 50 horas estas bacterias fueron tolerantes a valores de acidez titulable entre 1.3-2.98 % y de pH entre 4-4.5. El crecimiento no fue mayor en la zona aerobia de la masa MKD donde la acidez se incrementó al final de la fermentación. Por otra parte, no hubo relación entre el comportamiento de la acidez titulable y

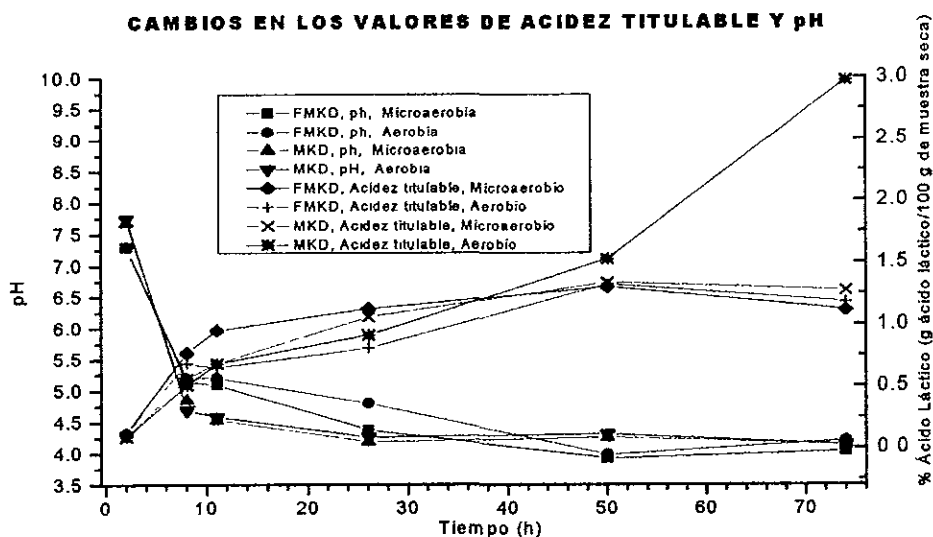


Figura 11. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de las muestras.

el del pH para el caso del crecimiento de las bacterias mesófilas. Se presentó el mismo comportamiento del crecimiento, la acidez y el pH durante las primeras 50 h de fermentación que el observado en las bacterias lácticas (Figura 13). A partir de las 50 h se observó una ligera intolerancia de las bacterias mesófilas a la elevada acidez y bajo pH. El caso mas claro es el de la zona aerobia de la masa MKD, donde de las 50 a las 74 h un aumento de 68% de la acidez provocó una disminución de la población en un 6.32%. En este mismo lapso de tiempo, en la zona microaerobia de la masa FMKD al disminuir la acidez en un 18.18% la población aumentó en un 24.28%.

La población de enterobacterias disminuye, como se observa en la figura 14. Durante las primeras 26 h se registró la mayor velocidad de desaparición ($m=-0.046 \log \text{ UFC/h}$), cuando el pH promedio bajó de 7.5 a 4.4 y la acidez aumentó de 0.10 a 0.98%. En la zona aerobia de la masa MKD, a porcentajes de acidez titulable mayores de 1.2% desapareció el 14.55% de la población presente a las 50 h, mas no se registró su desaparición, lo que indica una gran resistencia a valores de acidez elevados.

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS
EN RELACIÓN CON LA VARIACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE**

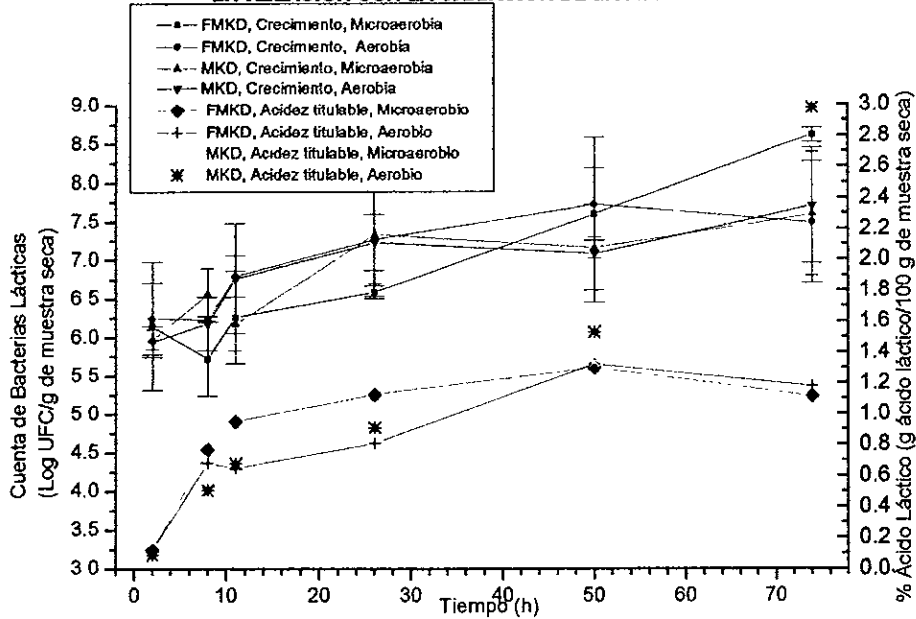


Figura 12. Cuenta de bacterias lácticas evaluada en Agar MRS y variación de la acidez titulable. Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras.

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS MESÓFILAS
EN RELACIÓN CON LA VARIACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE**

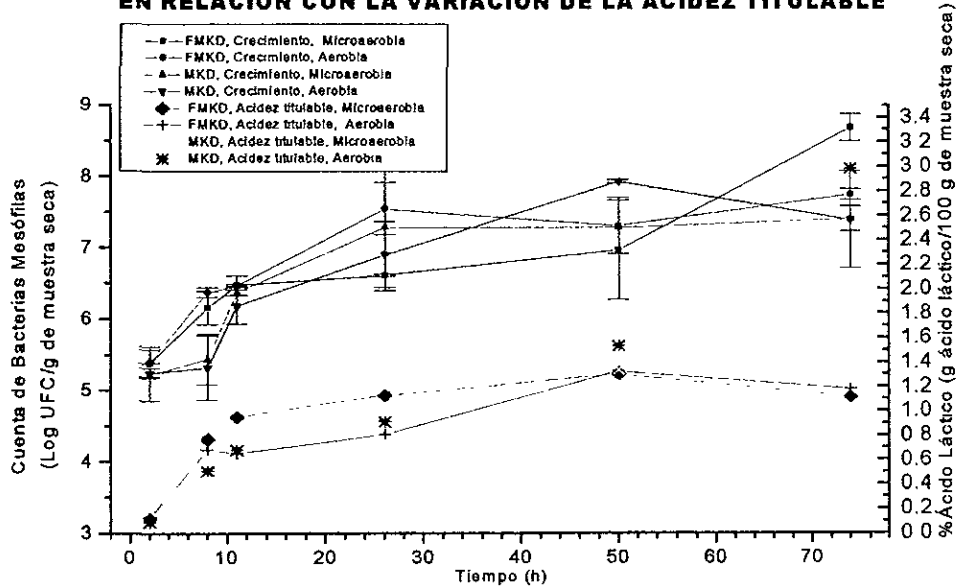


Figura 13. Los valores graficados son el promedio de duplicados del análisis de las muestras

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS ENTEROBACTERIAS EN RELACIÓN CON LA VARIACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE

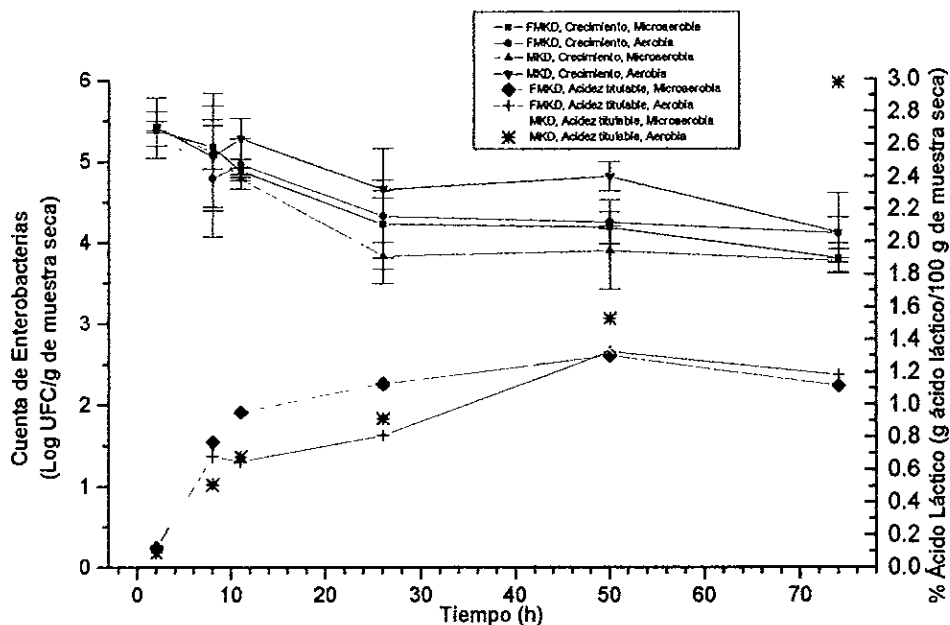


Figura 14. Los valores graficados son el promedio del duplicado del análisis de las muestras.

Ácidos generados durante la fermentación

- **Ácido Láctico:**

El ácido láctico es el principal producto del metabolismo de las bacterias lácticas y se detectó en ambas muestras (Figura 15). La mayor velocidad de producción se tuvo durante las primeras 11 h de la fermentación, lo que coincide con la máxima velocidad de crecimiento. A partir de ese momento la concentración del mismo permaneció constante hasta las 50 h, momento en el que se registra un nuevo aumento en la concentración. Esto probablemente se debió a una sustitución de bacterias menos resistentes a las condiciones de acidez elevada y bajo pH presentes entonces por otras con mayor resistencia a estas condiciones las que, además, produjeron mayores cantidades de ácido láctico.

VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO DURANTE LA FERMENTACIÓN

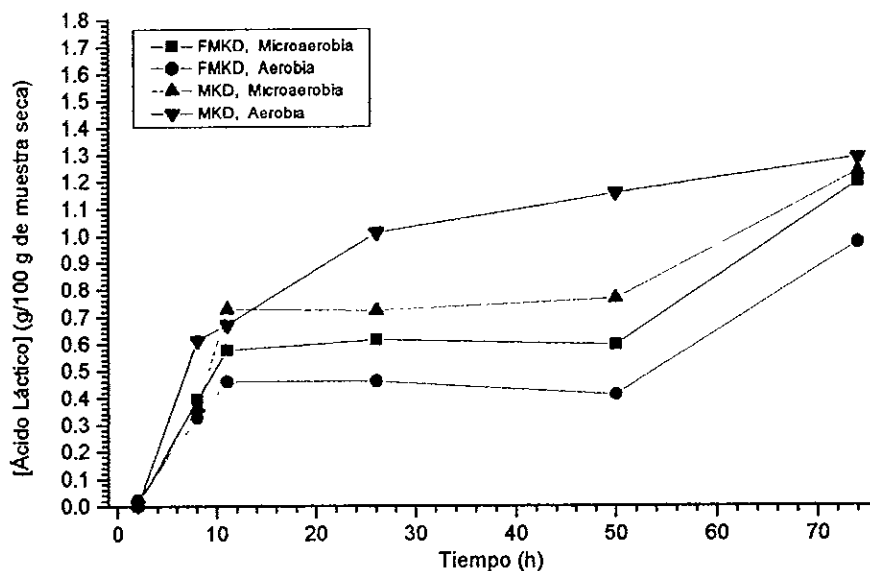


Figura 15. El ácido láctico fue cuantificado por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

- **Ácido Acético:**

El período de mayor crecimiento y actividad metabólica representa también el período de mayor producción de ácido acético. Tal y como ocurrió con el ácido láctico, entre las 11 y las 50 h en las muestras FMKD y en la zona aerobia de la masa MKD, la concentración permaneció constante (Figura 16), con un nuevo incremento al final de la fermentación. De acuerdo a la explicación anterior, esto pudo deberse a la sustitución de bacterias homofermentadoras presentes al inicio de la fermentación por bacterias heterofermentadoras. En tanto, en la zona microaerobia de la masa MKD la velocidad de producción aumentó a partir de las 26 h. Esta velocidad fue menor a las observadas en las otras 3 muestras, lo que sugiere una menor proporción de bacterias heterofermentadoras o una capacidad de producción de ácido acético menor de las bacterias presentes en esta muestra.

- **Ácido Fórmico**

Se detectó la presencia de ácido láctico y acético, productos de un metabolismo heterofermentativo, pero no del ácido fórmico que también es un producto de este tipo de metabolismo. Las posibles causas que evitaron el registro de este ácido pudieron radicar en que se produjese en concentraciones menores al límite mínimo de detección, a que se evaporase durante el tratamiento de la muestra o a su ausencia real.

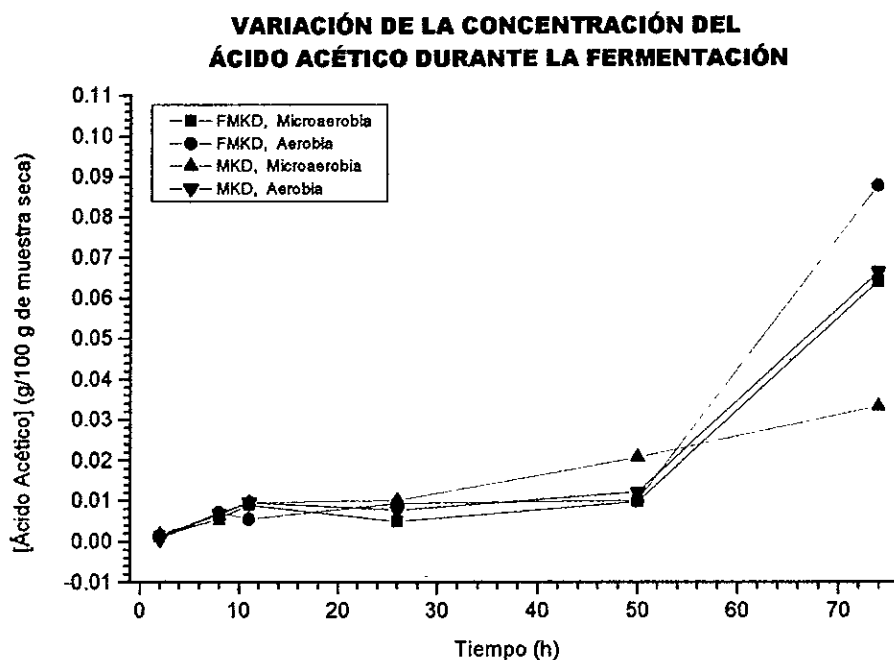


Figura 16. El ácido acético fue cuantificado por HPLC en columna Aminex
En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

En ambas muestras (MKD y FMKD) el ácido láctico fue el predominante durante toda la fermentación, tanto en la zona aerobia como en la microaerobia (Figuras 17 y 18).

VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS EN LA MASA DEL MERCADO

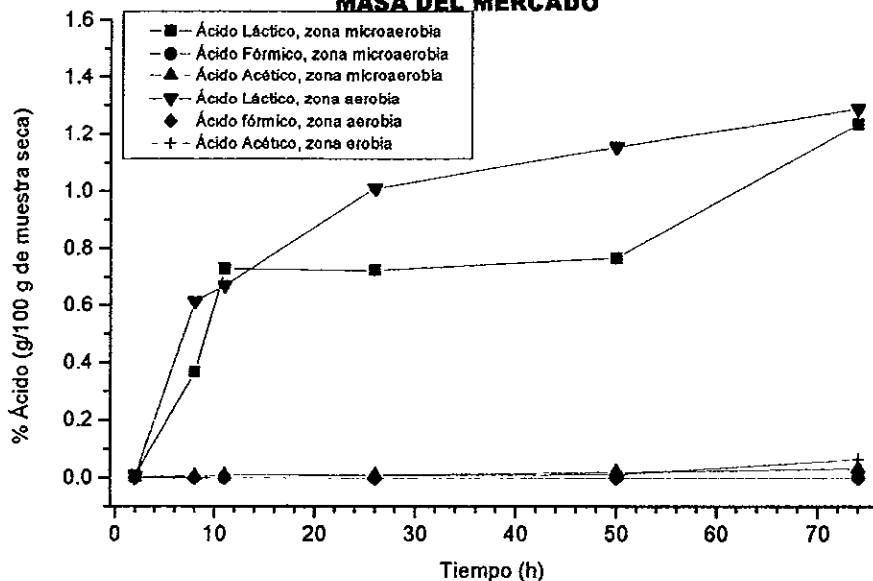


Figura 17. Los ácidos se cuantificaron por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS EN LA MUESTRA DE FUERA DEL MERCADO

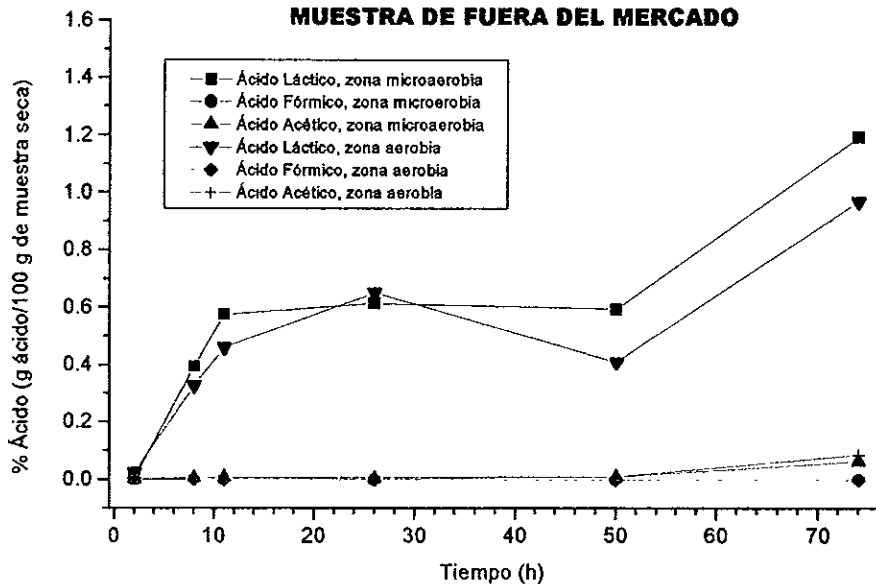


Figura 18. Los ácidos se cuantificaron por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

Cuantificación del almidón soluble

Se sabe que durante la nixtamalización se pierde un 0.6% del almidón del maíz (Pfulgfelder y col., 1988), y también se ha estimado el contenido de almidón de los granos en un 61-78% (59.5% en promedio). Se conoce el porcentaje aproximado de amilosa (fracción mas soluble) en el almidón, que es del 65% (Fennema, 1993). Con base en esto, el porcentaje aproximado de amilosa al inicio de la fermentación sería aproximadamente 32.44%. Los porcentajes iniciales de almidón soluble en ambas masas son relativamente cercanos a este intervalo de valores (Figura 19) tomando en cuenta que hay variaciones de acuerdo al tipo de maíz, al estado de maduración, a las operaciones en el proceso de elaboración y a la presencia de la amilopectina.

La masa del mercado contaba con una mayor concentración de almidón soluble al inicio de la fermentación, lo que posiblemente se debió a una molienda mas fina y a un proceso de cocción con temperaturas y tiempos mayores. Estos posiblemente provocaron tanto la gelatinización como la hidrólisis del almidón, dando origen a una mayor cantidad de almidón soluble fácilmente accesible para las enzimas. Se registró un mayor consumo del almidón soluble inicial en la masa MKD ya que se consumió en promedio el 62.3% del almidón inicial. En contraste, en la masa FMKD solo se consumió el 41.71% en promedio y el consumo se detuvo desde las 11h. Esto sugiere una mayor proporción de microorganismos amilolíticos en la masa MKD. Los microorganismos amilolíticos parecen encontrarse en mayor proporción en la zona aerobia de la masa, independientemente de su origen, puesto que el almidón soluble es más alto en la zona microaerobia de la masa FMKD y a partir de las 11 h en la masa MKD.

Actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula

Se determinaron las actividades amilolíticas extracelular y asociada a la célula debido a que no se sabe con certeza la ubicación de las enzimas amilolíticas presentes en el pozol. En la masa MKD ocurre una disminución de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula durante las primeras 8 h de fermentación. Después ya no se detectó actividad extracelular en la zona microaerobia (Figura 20). En la zona aerobia se registró incremento de la actividad

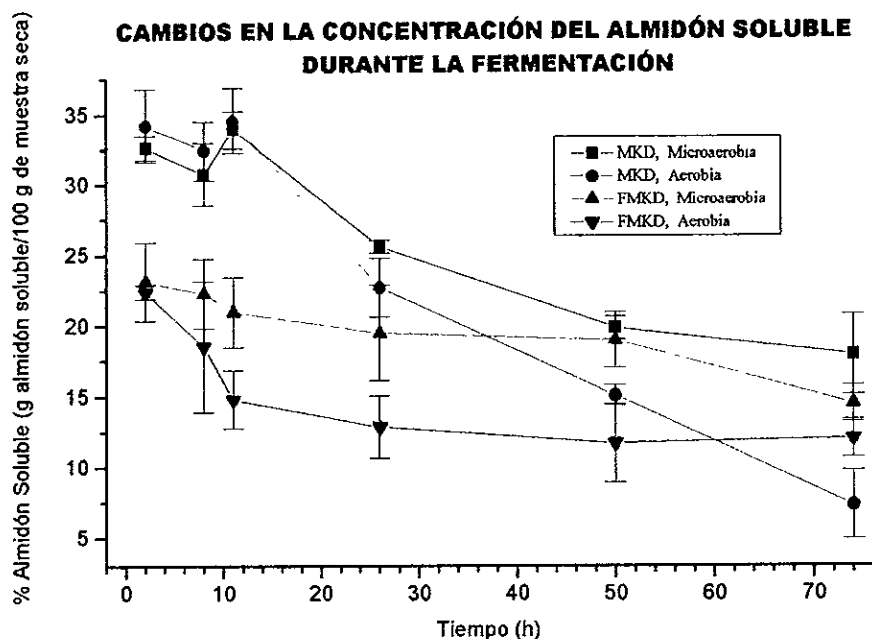


Figura 19. Cuantificación del almidón soluble con lugol por el método de Oteng-Gyank. Los valores graficados son el promedio de triplicados del análisis de las muestras

extracelular a partir de las 11 h mientras que la actividad asociada a la célula fue disminuyendo durante la misma aunque no llegó a anularse. En la zona microaerobia se registró un aumento de la actividad a las 26 h y posteriormente disminuyó. Esto sugiere diferencias en el efecto que la acidez ejerció sobre las amilasas presentes. Las amilasas extracelulares presentes en la zona aerobia después de las 11 h de fermentación aumentaron su actividad a medida que la acidez aumentó, mientras que disminuyó la de las amilasas asociadas a la célula de las zonas aerobia y microaerobia.

La actividad extracelular de la zona microaerobia en la masa FMKD presentó un máximo a las 8 h y posteriormente disminuyó hasta desaparecer a las 50 h de fermentación (Figura 21). A las 8 h el pH fue de 4.86 y la acidez de 0.77% (base seca), condiciones posiblemente óptimas para este tipo de amilasa. Las amilasas extracelulares de la zona aerobia disminuyeron su actividad desde el inicio de la fermentación y ya no se detectaron a las 50 h, cuando el pH era de 4.32 y la acidez de 1.32% (base seca). Las asociadas a la célula registraron aumentos de actividad a las 50 h para las de la zona aerobia y a las 74 h para las de la zona microaerobia. Lo anterior sugiere la aparición de amilasas distintas a lo largo de la fermentación, de acuerdo a

las condiciones de acidez y pH durante la misma. Las diferencias en el comportamiento de la actividad amilolítica en ambas muestras indican que existe un mayor número de cepas amilolíticas en la muestra del MKD, que a la vez son diferentes a las presentes en la muestra FMKD, con máximos de actividad que se presentaron a diferentes tiempos de fermentación (Tabla VII) bajo condiciones distintas de pH y acidez.

Tabla VII. Tiempos en los que se alcanzaron las actividades amilolíticas máximas en las masas MKD y FMKD

	Zona microaerobia		Zona aerobia	
	Actividad extracelular	Actividad asociada a la célula	Actividad extracelular	Actividad asociada a la célula
MKD	2 h	2 y 26 h	74 h	8 h
FMKD	8 h	2 h	2 h	2 h

A pesar de que en la masa MKD se dio un mayor consumo de almidón soluble, se tuvo una menor producción de azúcares reductores en relación a la cantidad de proteína, lo que indica que posiblemente una gran parte del almidón se hidrolizó a oligosacáridos sin poder reductor, como la trehalosa y las dextrinas, las cuales se producen a partir de la hidrólisis del almidón a pH de 2.5 a 4.

Variación de la concentración de los azúcares solubles

- **Disacáridos**

Los disacáridos presentes se habían agotado a las 8 h (Figura 22). Después se aprecia un incremento lo que puede deberse a la presencia de cierto tipo de actividad amilasa que genera maltosa a partir del almidón. Cabe señalar que en la zona microaerobia de la masa MKD se tuvo la mayor concentración de almidón soluble y fue en esta misma zona donde se registró un aumento de disacáridos, lo que sugiere que debido a la actividad amilolítica parte del almidón insoluble se solubilizó por hidrólisis y se produjeron mono y disacáridos. Al final de la fermentación, la concentración de disacáridos en esta zona disminuyó, lo que posiblemente se debió a un aumento en el consumo por parte de los microorganismos presentes. En la zona

Actividad amilolítica (mg azúcares reductores producidos/g proteína total)

ACTIVIDADES AMIOLÍTICAS EXTRACELULAR Y ASOCIADA A LA CÉLULA REGISTRADAS EN LA MASA PROVENIENTE DEL MERCADO A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

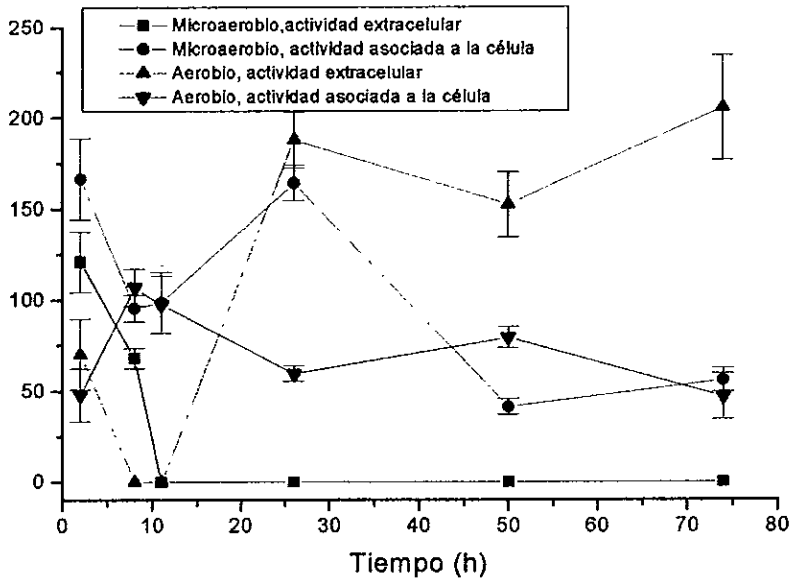


Figura 20. Los azúcares reductores se cuantificaron con DNS. Los valores graficados son el promedio del sextuplicado del análisis de las muestras.

Actividad amilolítica (mg azúcares reductores producidos / g proteína total)

ACTIVIDADES AMIOLÍTICAS EXTRACELULAR Y ASOCIADA A LA CÉLULA REGISTRADAS EN LA MASA PROVENIENTE DE FUERA DEL MERCADO A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

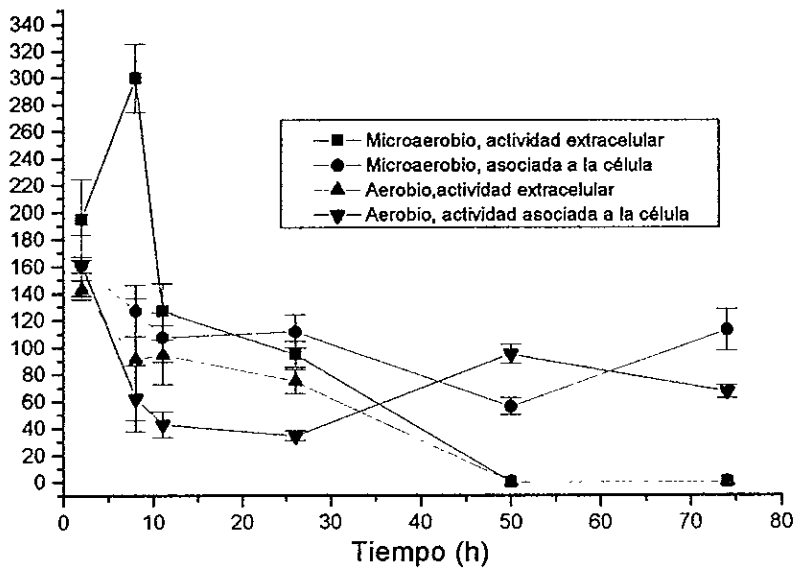


Figura 21. Los azúcares reductores se cuantificaron con DNS. Los valores graficados son el promedio del sextuplicado del análisis de las muestras.

aerobia no hay disacáridos a partir de las 8 h lo que sugiere la posibilidad de que las amilasas extracelulares presentes hidrolicen el almidón en oligosacáridos de mayor tamaño.

Para la masa FMKD, la mayor concentración de disacáridos se tuvo en la zona aerobia a pesar de que fue en la zona microaerobia donde se detectó mayor concentración de almidón soluble. Cabe recordar que en la zona aerobia de esta masa, a las 50 h se tuvo la máxima actividad amilolítica asociada a la célula, lo que sugiere que dichas amilasas producen maltosa a partir de la hidrólisis del almidón. A partir de las 50 h la concentración de disacáridos se mantuvo constante, lo que pudo deberse a que las enzimas dejaron de actuar por las condiciones de acidez y pH, o bien, a que la velocidad de producción y consumo de azúcares es la misma.

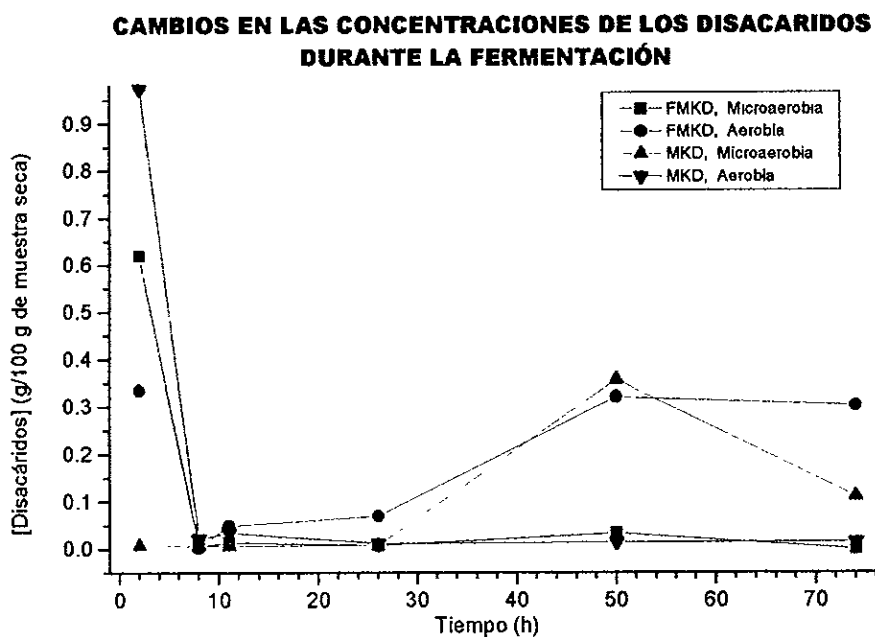


Figura 22. Los disacáridos se cuantificaron por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

• Glucosa

La concentración de glucosa aumentó a partir de las 26 h en la zona microaerobia de la masa MKD, mientras que en la zona aerobia la concentración fue prácticamente nula durante toda la fermentación (Figura 23). A pesar de que hubo mayor concentración del almidón soluble en la

zona aerobia, fue en la zona microaerobia donde se registró la mayor concentración de glucosa. Esto quiere decir que la hidrólisis del almidón soluble en la zona aerobia no solo produjo glucosa y maltosa, sino que posiblemente también se generaron dextrinas y oligosacáridos, como la maltotriosa y maltotetrosa. En la zona microaerobia hubo producción de glucosa y disacáridos, aunado a una hidrólisis de los disacáridos a partir de las 50 h, lo que dio como resultado un aumento en la concentración de glucosa. Esto sugiere dos posibilidades: que en la zona microaerobia de la masa MKD se contara con una mayor proporción de maltasas y/o glucoamilasas o que en esta zona se tuviera una mayor actividad de las mismas favorecida por las condiciones en el medio.

En la masa FMKD la concentración de glucosa en la zona microaerobia durante toda la fermentación fue prácticamente nula, lo que pudo deberse a un consumo casi inmediato por parte de los microorganismos presentes o bien a la hidrólisis del almidón en diversos oligosacáridos. En la zona aerobia se registró un aumento de la concentración de glucosa a partir de las 11 h y hasta las 50 h de fermentación, seguido de una disminución. Este comportamiento pudo deberse a una elevada actividad glucoamilolítica que a las 50 h fue afectada negativamente por las condiciones del medio.

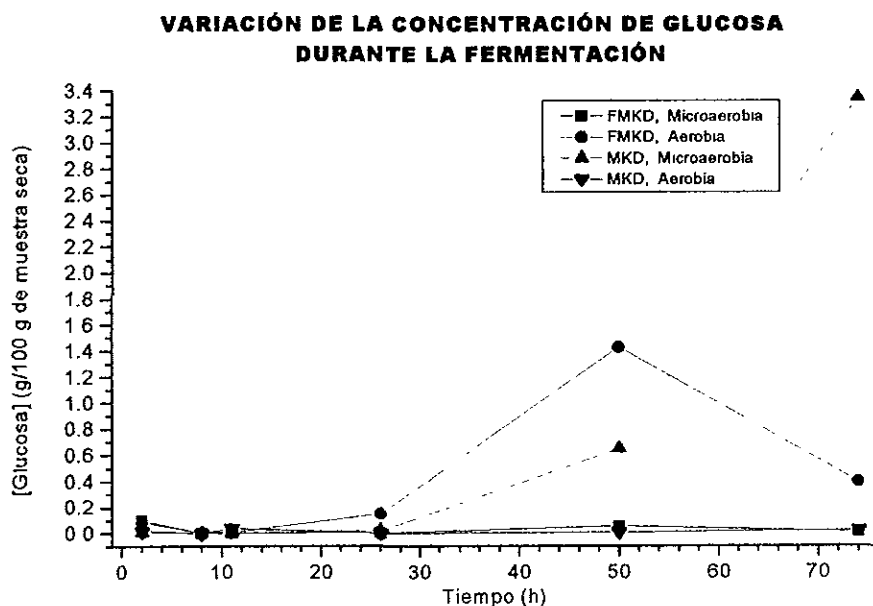


Figura 23 La glucosa se cuantificó por HPLC en columna Aminex
En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

- **Fructosa**

En la masa FMKD se observó un aumento en la concentración de fructosa en ambas zonas de la masa hasta las 52 h aproximadamente. En tanto, las concentraciones del monosacárido en zona microaerobia continuaron incrementándose mientras que las de la zona aerobia disminuyeron hacia el final de las 74 h de fermentación (Figura 24). La masa MKD presentó concentraciones mayores en la zona microaerobia a partir de las 8 h de fermentación. De las 50 h en adelante se incrementó la producción de la fructosa en la zona microaerobia. Al final de la fermentación se tuvieron concentraciones y velocidades de producción de fructosa mayores en las zonas microaerobias, siendo mayores las de la masa FMKD.

La concentración de fructosa podría variar debido, entre otras cosas, a factores relacionados al consumo y disponibilidad de sacarosa. Esta se encuentra presente prácticamente durante todo el tiempo de fermentación. A pesar de que los resultados mostraron que en las primeras 8 h se consumieron todos los disacáridos iniciales, cabe la posibilidad que la sacarosa en particular haya sido retenida en la red formada por el almidón y la fibra del maíz, haciéndose insoluble y, por consiguiente, incuantificable. Sin embargo, al degradarse la red por la hidrólisis continua del almidón, el disacárido quedaba liberado y se hidrolizaba continua e inmediatamente en glucosa y fructosa. Esto podría explicarse por la presencia de actividad invertasa en alguno o algunos de los microorganismos presentes. Una segunda explicación podría ser la síntesis de novo. En la vía homoláctica de la fermentación de la glucosa en las bacterias lácticas se produce fructosa-6-P y fructosa-1,6-DP, las cuales son solubles y se cuantifican como fructosa.

Los valores de los monosacáridos y disacáridos encontrados en este trabajo no concuerdan con los datos reportados por Flores Piña (1998) para masa de maíz nixtamalizada y fermentada, en la cual las concentraciones de los monosacáridos (Tabla VIII) tanto al inicio como a las 72 h de fermentación en general son inferiores a las registradas en el presente estudio.

Al comparar el comportamiento de los azúcares solubles ilustrado en las figuras 25 y 26 solamente se observó una disminución de disacáridos acompañada de un aumento de fructosa en la zona aerobia de la masa MKD. La falta de relación en las zonas restantes puede deberse a

**VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FRUCTOSA
DURANTE LA FERMENTACIÓN**

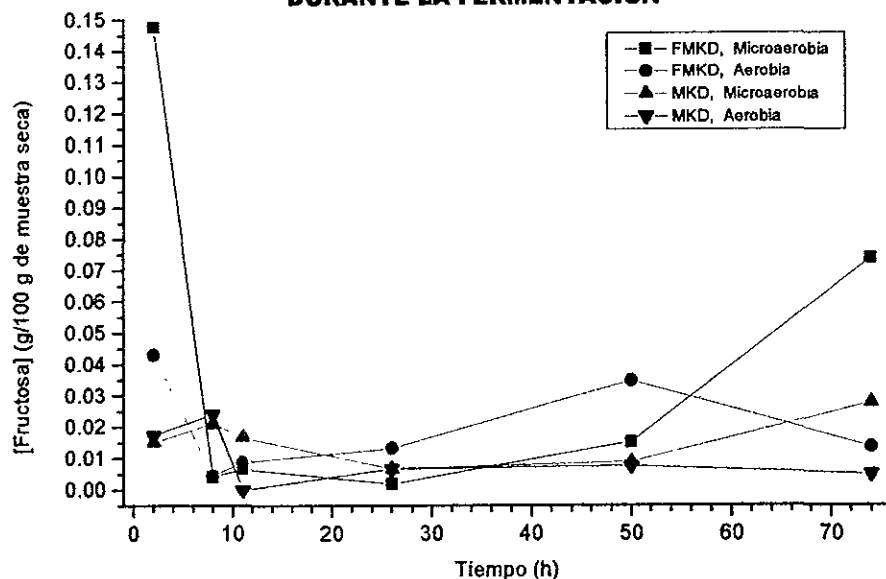


Figura 24. La fructosa se cuantificó por HPLC en columna Aminex
En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

Tabla VIII. Concentración de los azúcares encontrados en masa de maíz nixtamalizada y fermentada.^a

Tiempo de fermentación (h)	g/100 g de masa base seca			
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa
0	0.05±0.03	0.06±0.01	1.3±0.105	0.9±0.076
72	0.008±0.002	0.007±0.002	0	0.2±0.011

^aFuente: Flores Piña, 1998.

la complejidad del medio y a la cantidad de interacciones y factores que intervienen como lo es el consumo diferencial de los microorganismos y la hidrólisis del almidón en una gran variedad de compuestos.

La disminución de la glucosa, la fructosa y de los disacáridos durante las primeras 8 h de fermentación señala que dichos azúcares simples constituyen el sustrato fermentable en este primer intervalo de tiempo, para posteriormente ser sustituidas por el almidón como principal sustrato.

VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AZÚCARES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA MASA PROVENIENTE DE LA POZOLERÍA UBICADA DENTRO DEL MERCADO

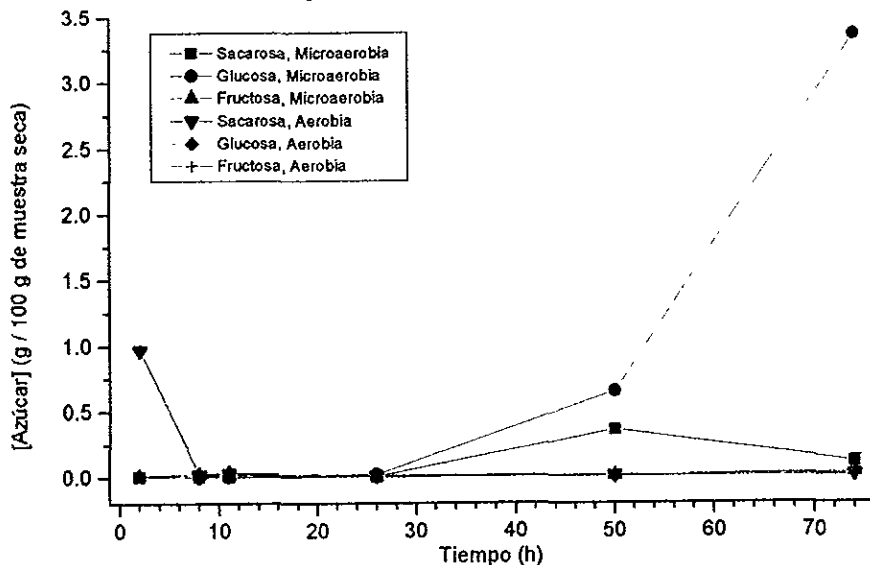


Figura 25. La glucosa, fructosa y sacarosa se cuantificaron por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AZÚCARES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA MASA PROVENIENTE DE FUERA DEL MERCADO

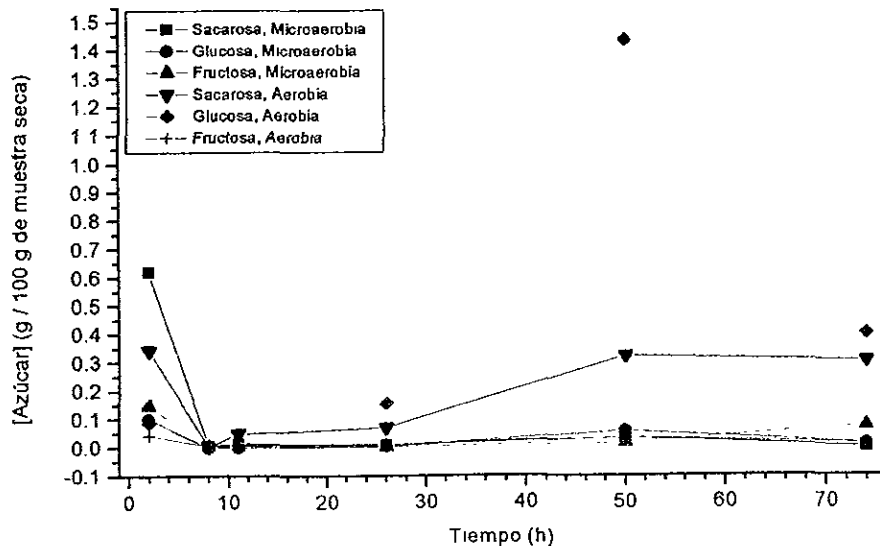


Figura 26. La glucosa, fructosa y sacarosa se cuantificaron por HPLC en columna Aminex. En todos los casos se obtuvo una ds menor a 0.001

7.- CONCLUSIONES

I: COMPORTAMIENTO DE LOS GRUPOS MICROBIANOS

Los grupos microbianos presentes fueron bacterias lácticas, mesófilos aerobios, enterobacterias, así como hongos y levaduras.

Los grupos presentes variaron en sus niveles iniciales y finales de la siguiente manera:

GRUPO	Log UFC/g de muestra seca	
	INICIAL	FINAL
Bacterias lácticas	6	7.8
Bacterias Mesófilas	5.3	7.8
Enterobacterias	5.4	4
Hongos y Levaduras	3	6.8

II. Las diferencias en la higiene del proceso de elaboración de la masa de pozol no repercutieron en el comportamiento general de los grupos de bacterias lácticas, bacterias mesófilas, enterobacterias, hongos y levaduras.

III. Las condiciones de aerobiosis y microaerobiosis afectan en forma diferenciada el crecimiento de los grupos microbianos de acuerdo al origen de las muestras.

- Ocurre una diferencia significativa en los grupos de bacterias lácticas y bacterias mesófilas, cuyas cuentas finales en la zona microaerobia de la masa elaborada en las condiciones mas higiénicas son ligeramente mayores que el promedio (8.7 vs. 7.4 log UFC/g muestra seca).
- Las cuentas de enterobacterias de la zona aerobia de la masa elaborada en las condiciones menos higiénicas fueron mayores que las de la zona microaerobia en el intervalo entre las 11 y las 50 h de fermentación, con diferencias entre 0.5 y 0.9 log UFC/g de muestra seca.

- No se registró diferencia entre las cuentas de enterobacterias de las zonas aerobia y microaerobia de la masa elaborada en las condiciones mas higiénicas.
- No hubo diferencia entre las cuentas de hongos y levaduras de la zona erobia y microaerobia de ninguna de las masas.

IV. Se detectaron las siguientes relaciones entre los cambios fisicoquímicos ocurridos en las masas analizadas y el comportamiento de los diferentes grupos microbianos:

- La población de bacterias lácticas se incrementó conforme se registró un aumento en la acidez. La mayor velocidad de crecimiento (0.0447 log UFC/h) estuvo acompañada de la mayor velocidad de acidificación del medio (0.2407 g de ácido láctico/h) y la mayor disminución del pH (de 7.5 a 4.4).
- La población de bacterias mesófilas presentó crecimiento aún cuando se preentó descenso en el pH y un incremento en la acidez .
- La población de enterobacterias disminuyó a medida que aumentó la acidez durante la fermentación. La mayor disminución de la población se presentó durante las primeras 26 h (de 5.4 a 4.3 log UFC/g de muestra seca) cuando la acidez titulable promedio aumentó de 0.1 a 0.98% y el pH disminuyó de 7.5 a 4.4.
- No se puede concluir, por la naturaleza de la experimentación llevada a cabo, que existen diferencias en las microbiotas presentes en cada muestra.

V. Se encontraron las siguientes relaciones entre el comportamiento de metabolitos y las diferencias en el comportamiento de la flora microbiana en cada muestra:

- En virtud de que la flora láctica es la dominante, el ácido orgánico más abundante es el ácido láctico. La mayor velocidad de producción se presenta durante las primeras 11 h de

fermentación. Posiblemente por la naturaleza de la flora presente, en el intervalo de las 26 a las 50 h la producción es mayor en la zona aerobia de la masa elaborada en las condiciones menos higiénicas.

- La mayor producción de ácido acético se presenta a partir de las 50 h de fermentación, con concentraciones significativamente mayores en las zonas aerobias al final de la fermentación.
- No se detectó la presencia de ácido fórmico en las muestras.
- El consumo de almidón soluble inicial fue mayor en la masa elaborada en las condiciones menos higiénicas, en donde se redujo en un 62.3% comparado con el 41.7% registrado en la otra masa. El mayor consumo se presentó en las zonas aerobias,
- Los disacáridos, la glucosa y la fructosa presentes al inicio de la fermentación se agotan a las 8 h de fermentación. Tanto los disacáridos como la glucosa registraron incrementos de concentración a partir de las 26 h de fermentación en la zona aerobia de la masa elaborada en las condiciones mas higiénicas y en la zona microaerobia de la otra muestra de masa. En las dos muestras restantes no se detectaron concentraciones significativas de estos azúcares.
- La concentración de fructosa se incrementa a partir de las 26 h en la muestra elaborada en las condiciones mas higiénicas y a partir de las 50 h en la zona microaerobia de la masa elaborada en las condiciones menos higiénicas.

VI. Se encontró actividades amilolíticas extracelular y asociada a la célula en ambas muestras de masa, cuyo comportamiento varía en respuesta a los niveles de acidez de las masas.

8.- RECOMENDACIONES

Los estudios microbiológicos son susceptibles al efecto de condiciones ambientales. Debido a que el muestreo se realizó a finales del mes de septiembre, la humedad ambiental era elevada por las continuas precipitaciones y las elevadas temperaturas que privaban en la ciudad de Villahermosa, Tab. Esto pudo haber generado variaciones en el proceso de fermentación por lo que se sugiere que, para futuros estudios, se realicen de preferencia en épocas de poca precipitación y temperatura ambiental baja.

Para confirmar las diferencias en la naturaleza de la microbiota sería conveniente determinar la diversidad de los microorganismos presentes durante la fermentación. Ante la complejidad presente en las muestras detectada simplemente por diferencias morfológicas en los medios de cultivo que sirvieron para contabilizar a la población, así como por las diferencias metabólicas encontradas entre las muestras, se considera que la caracterización debería realizarse por métodos moleculares

En el presente estudio se determinó actividad amilolítica total, con lo cual se determinó la ubicación general de las enzimas en el interior de la masa. Sin embargo, no se sabe aún si estas actividades son endo-amilolíticas y/o exo-amilolíticas, así como tampoco se conocen a los microorganismos responsables, por lo que el estudio de las mismas así como la caracterización ya sea global o particular de dichos microorganismos resulta de gran interés. Aunado a lo anterior, el estudio de las actividades invertasa y maltasa durante la fermentación de la masa de pozol permitirá en un futuro comprender mejor la forma mediante la cual se están consumiendo los carbohidratos de importancia durante la fermentación de la masa de pozol.

Cabe señalar que no se pudieron cuantificar por separado la maltosa y la sacarosa por falta de disponibilidad del equipo necesario, sin embargo, su cuantificación es posible y necesaria para futuros estudios relacionados.

9.- APÉNDICES

APÉNDICE 1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS MRS Y ACP

Agar MRS (De Man, Rogosa, Sharpe)

Versión solidificada del Caldo MRS para el cultivo de lactobacilos.

FÓRMULA	g/l
Peptona (BIOXON)	10.0
Polvo "Lab-Lemco" (DIFCO)	8.0
Extracto de levadura (DIFCO)	4.0
Glucosa (BAKER)	20.0
Sorbitán mono-oleato (SIGMA)	1 ml
Fosfato Dipotásico (BAKER)	2.0
Acetato sódico 3H ₂ O (MERCK)	5.0
Citrato triamónico (BAKER)	2.0
Sulfato de Mg 7H ₂ O (MERCK)	0.2
Sulfato de Mn 4H ₂ O (BAKER)	0.05
Agar (OXOID)	10.0

pH 6.2 ± 0.2

Agar ACP (Agar recuento placa estándar)

Medio estándar correspondiente a la fórmula APHA, para alimentos.

FÓRMULA	g/l
Extracto de levadura (DIFCO)	2.5
Casitone (DIFCO)	5.0
Glucosa (BAKER)	1.0
Agar (OXOID)	15.0

pH 7.0 ± 0.2

APÉNDICE 2. CURVA PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ALMIDON SOLUBLE

Tubo	ml. Soln. almidón soluble (0.40528mg/ml)	ml de solución de lugol al 4%	[almidón soluble] (mg/ml)
Blanco	0	3	0
1	0.075	2.925	0.0101
2	0.15	2.85	0.0202
3	0.225	2.775	0.0303
4	0.3	2.7	0.0405
5	0.375	2.625	0.0506
6	0.45	2.55	0.0607
7	0.525	2.475	0.0709
8	0.6	2.4	0.0810
9	0.675	2.325	0.0911

En la figura 27 se muestra la curva patrón de almidón soluble así como la ecuación de la recta correspondiente:

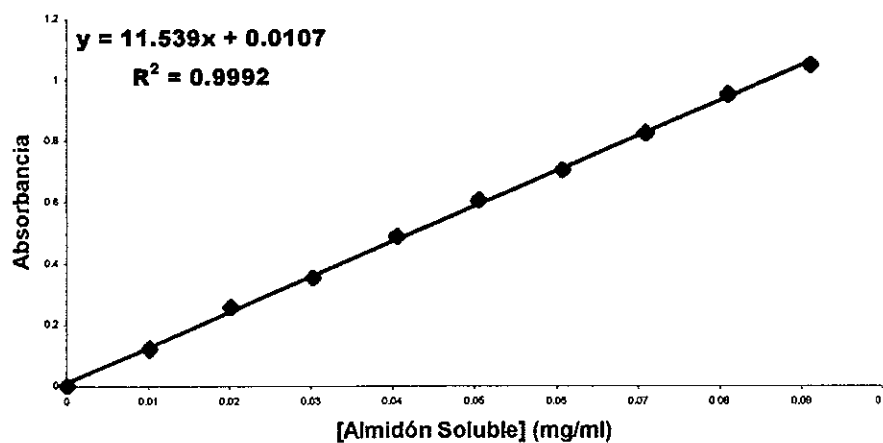


Fig. 27 Curva de calibración de Almidón Soluble en espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 21, $\lambda = 620 \text{ nm}$

APÉNDICE 3. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, GLUCOSA, FRUCTOSA, ÁCIDO LÁCTICO, ÁCIDO FÓRMICO Y ÁCIDO ACÉTICO POR HPLC

a) Curva patrón de sacarosa, glucosa, ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico.

	ml de Soln. stock de SGLFA al 1% o 10 g/L	ml de agua desionizada	[Glucosa] (g/L)	[Sacarosa] (g/L)	[Ácido Acético] (g/L)	[Ácido Láctico] (g/L)	[Ácido Fórmico] (g/L)
C	0.187	9.813	0.187	0.187	0.1368	0.1754	0.1264
D	0.375	9.625	0.375	0.375	0.2743	0.3517	0.2536
F	1.5	8.5	1.5	1.5	1.0975	1.4070	0.0146
H	6	4	6	6	4.3902	5.6280	4.0584

Todas las diluciones se guardaron en congelación a -20°C

b) Curva patrón de fructosa

ml de soln. stock de fructosa al 1.06% o 10.6 g/L	ml de agua desionizada	[Fructosa] (g/L)
2.5	0	10.6
2	0.5	8.48
1.5	1	6.36
1	1.5	4.24
0.5	2	2.12
0.25	2.25	1.06
0.125	2.375	0.53
0.0625	2.4375	0.265
0	2.5	0

Todas las diluciones se guardaron en congelación a -20°C

En las figuras 28, 29, 30, 31, 32 y 33 se muestran las curvas de calibración empleadas así como las ecuaciones de la recta correspondientes.

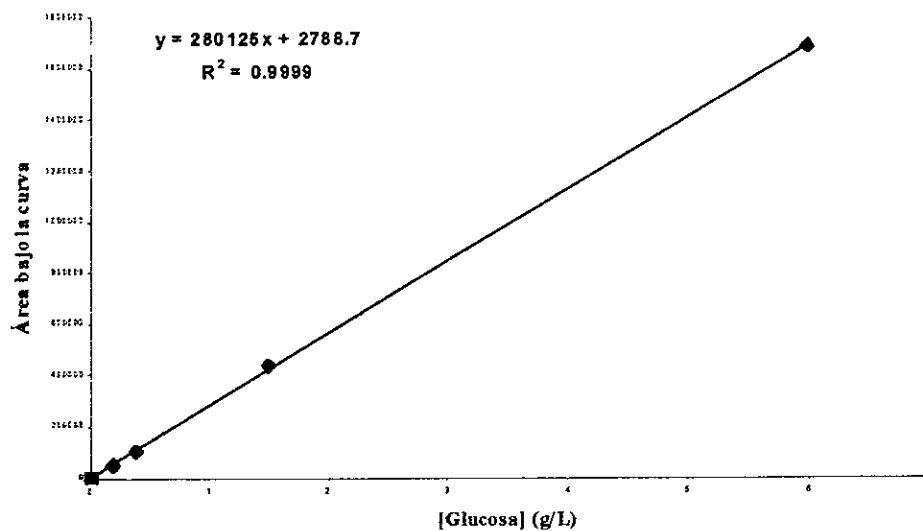


Fig. 28 Curva de calibración de glucosa en columna Aminex (Bio-Rad)

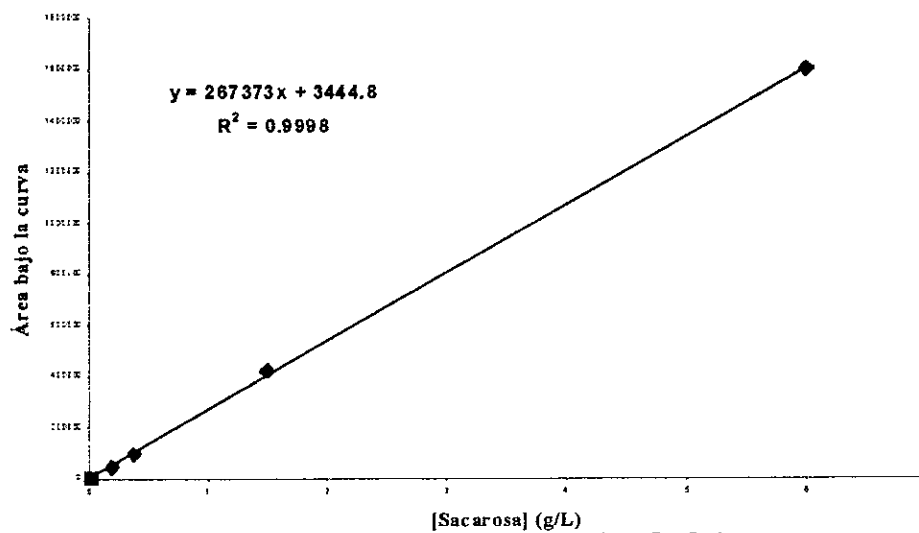


Fig. 29 Curva de calibración de sacarosa en columna Aminex (Bio-Rad)

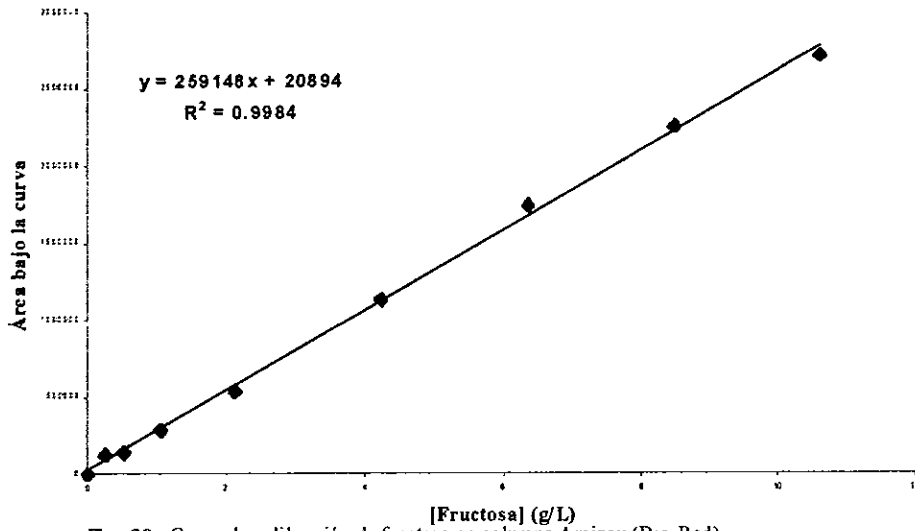


Fig. 30 Curva de calibración de fructosa en columna Aminex (Bio-Rad)

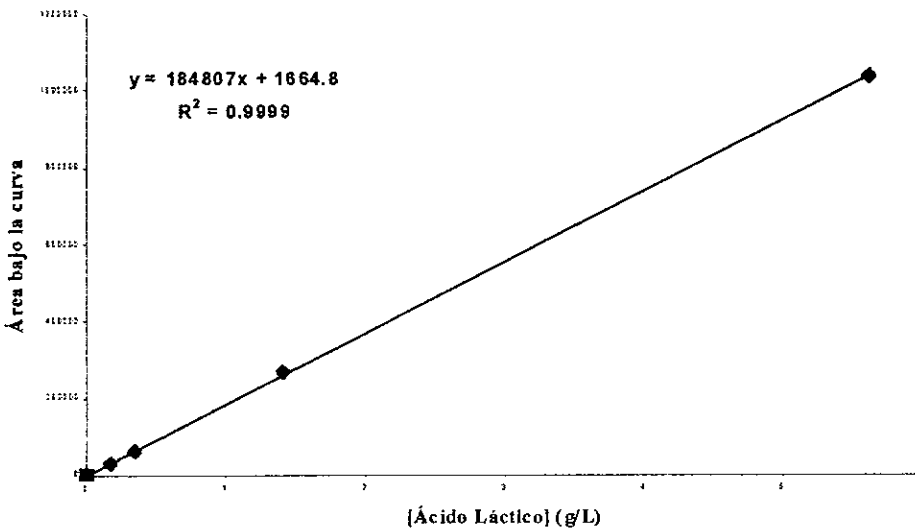


Fig. 31 Curva de calibración de Ácido Láctico en columna Aminex (Bio-Rad)

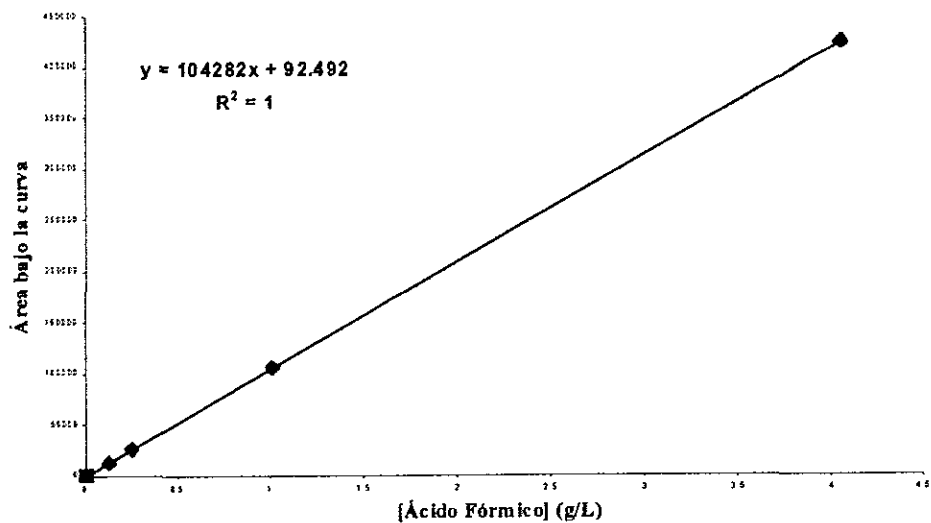


Fig. 32 Curva de calibración de ácido fórmico en columna Aminex (Bio-Rad)

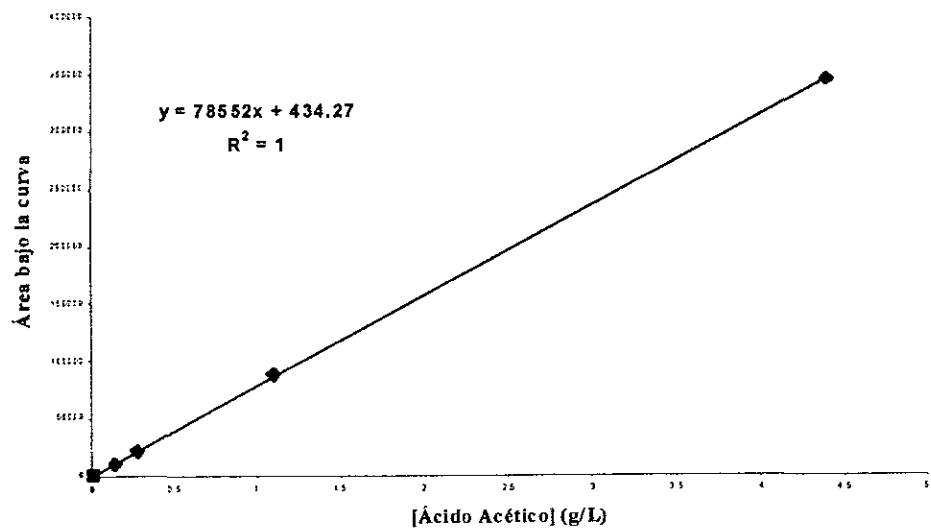


Fig. 33 Curva de calibración de ácido acético en columna Aminex (Bio-Rad)

APÉNDICE 4. CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS

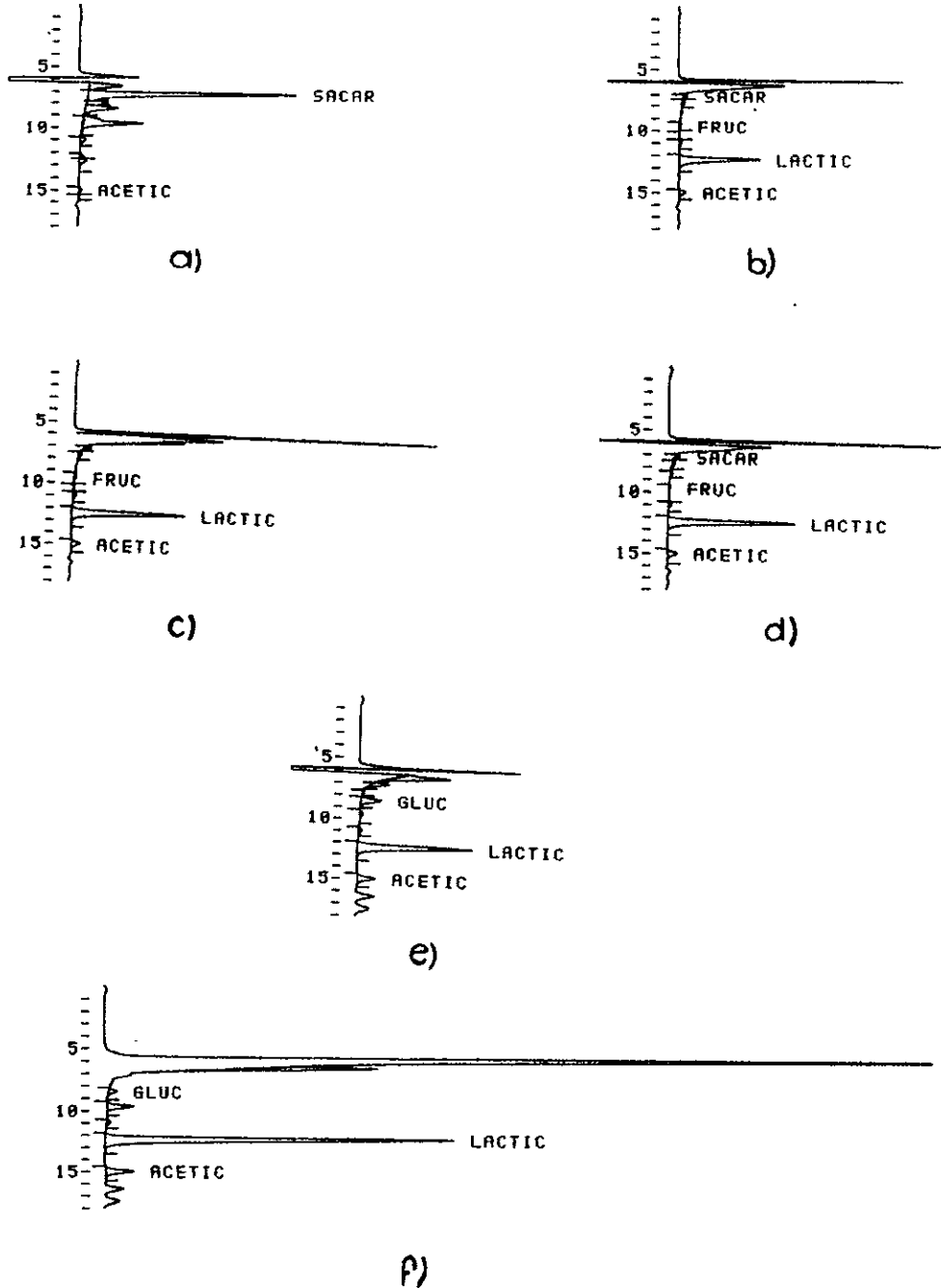


Fig. 34 Cromatogramas correspondientes a la zona microaerobia de la masa proveniente de la pozolería ubicada fuera del mercado. Las horas de fermentación correspondientes son: a) 2, b) 8, c) 11, d) 26, e) 50 y f) 74.

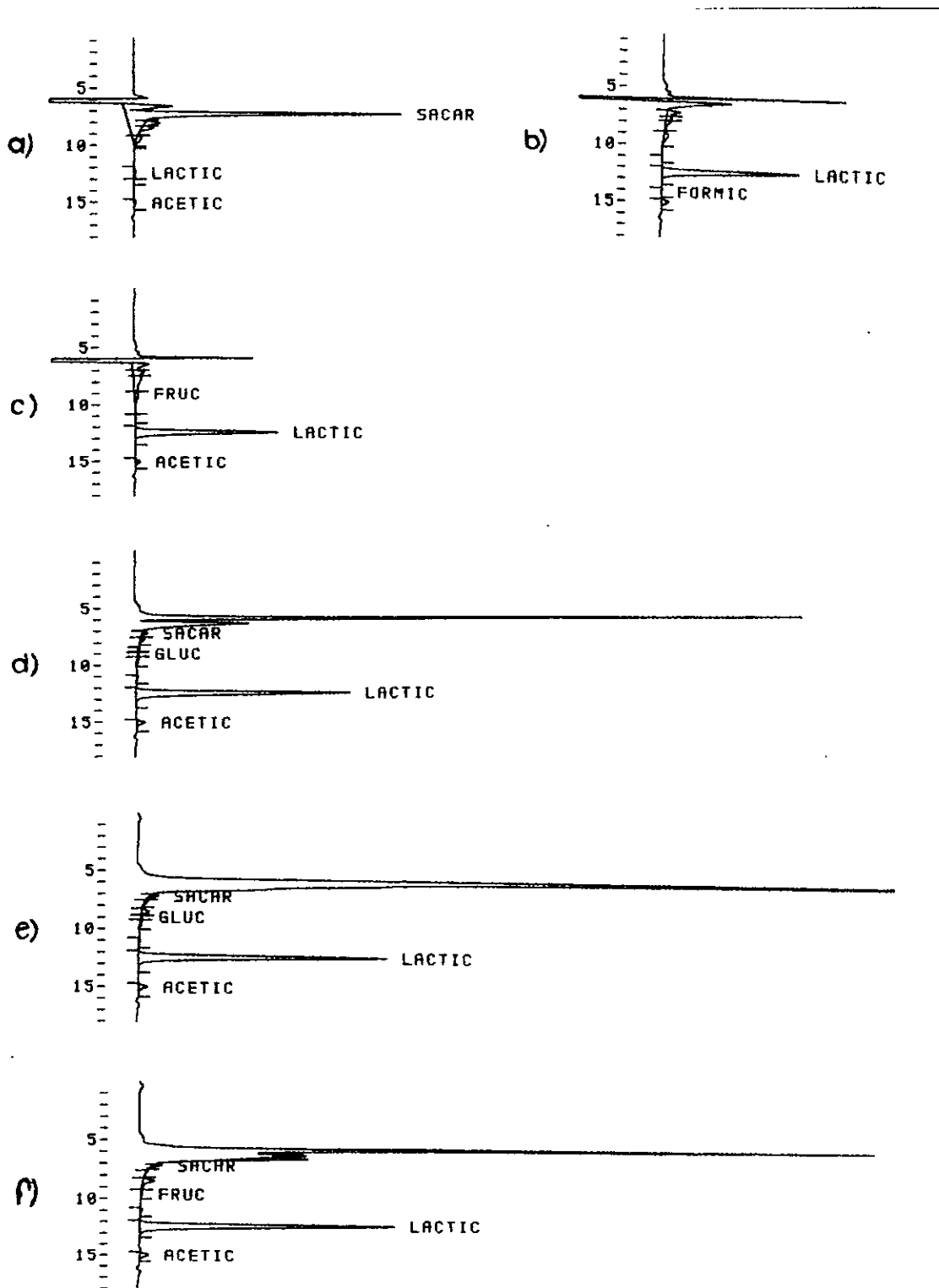


Fig. 35 Cromatogramas correspondientes a la zona aerobia de la masa proveniente de la pozolería ubicada fuera del mercado. Las horas de fermentación correspondientes son: a) 2, b) 8, c) 11, d) 26, e) 50 y f) 74.

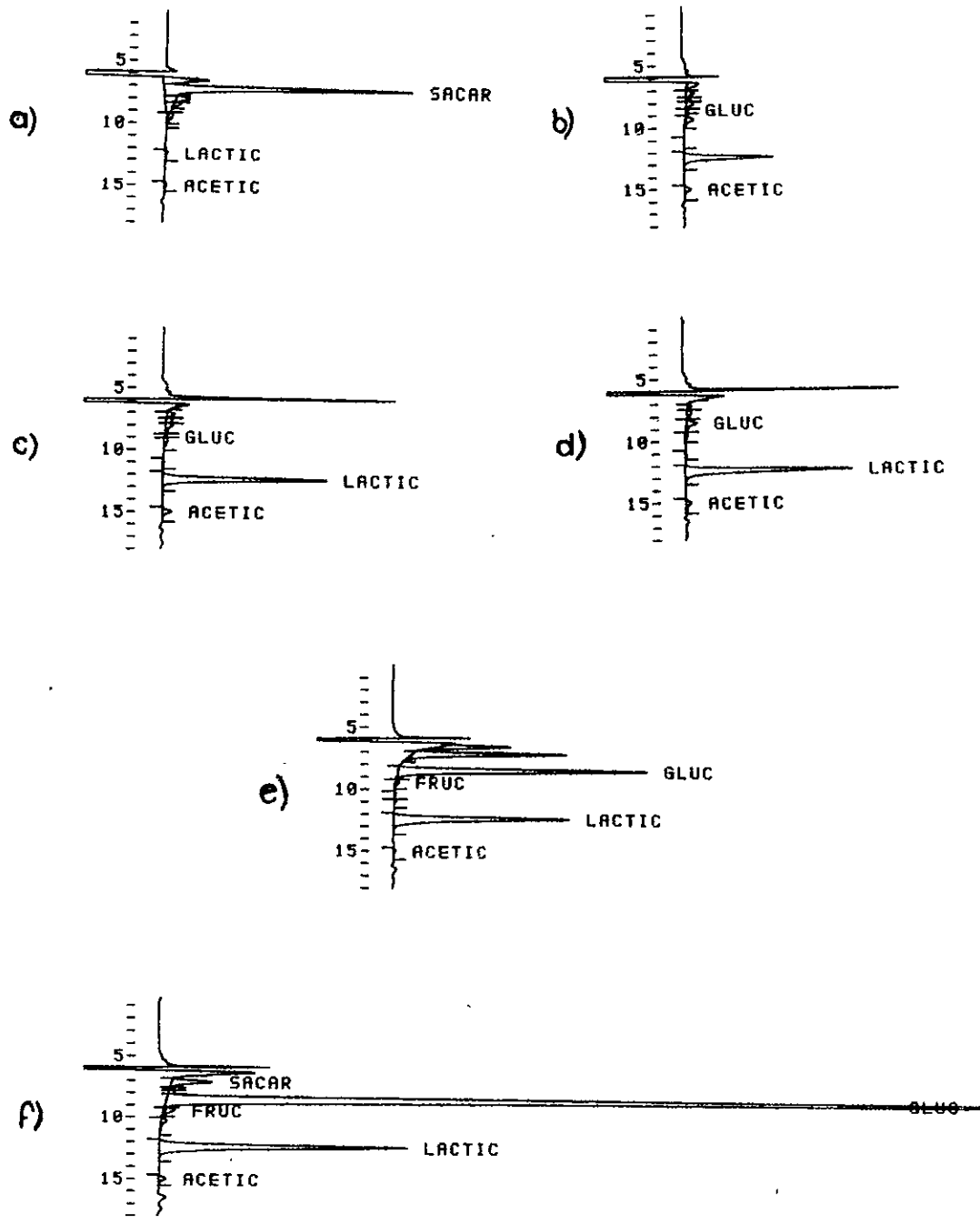


Fig. 36 Cromatogramas correspondientes a la zona microaerobia de la masa proveniente de la pozolería ubicada dentro del mercado. Las horas de fermentación correspondientes son: a) 2, b) 8, c) 11, d) 26, e) 50 y f) 74.

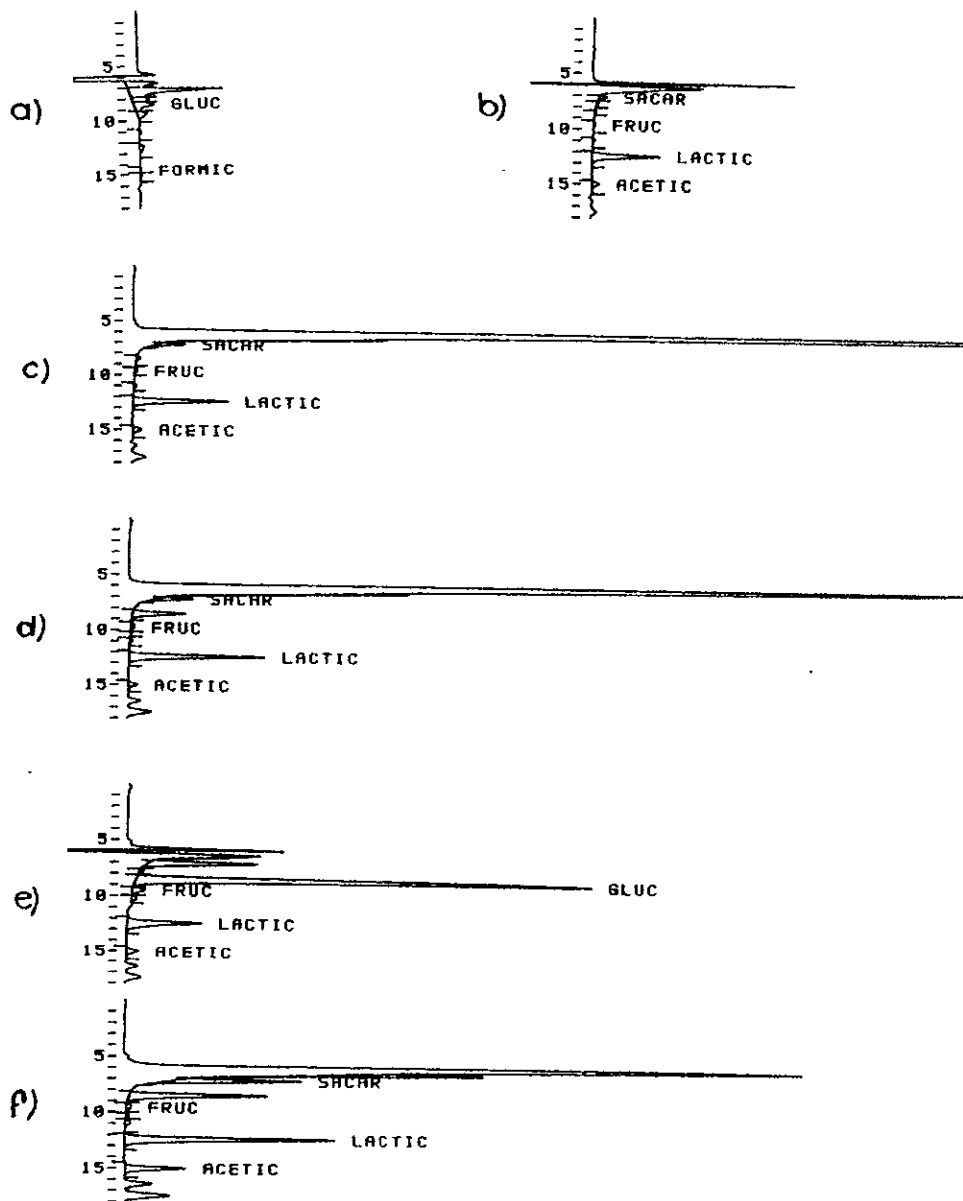


Fig. 37 Cromatogramas correspondientes a la zona aerobia de la masa proveniente de la pozolería ubicada dentro del mercado. Las horas de fermentación correspondientes son. a) 2, b) 8, c)11, d)26, e)50 y f)74.

APÉNDICE 5. CURVAS PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA EXTRACELULAR Y ASOCIADA A LA CÉLULA

Curva patrón de proteína

Tubo	Agua destilada (ml)	Solución de Albúmina de Suero Bovino [0.1032 mg/ml] (ml)	Soln. A (ml)	Soln. B (ml)	Absorbancia	[Proteína] (µg/ml)
1	1.0	0.0	1	0.5	0	0
2	0.9	0.1	1	0.5	0.076	4.128
3	0.8	0.2	1	0.5	0.1326	8.256
4	0.7	0.3	1	0.5	0.2086	12.384
5	0.6	0.4	1	0.5	0.253	16.512
6	0.5	0.5	1	0.5	0.316	20.64
7	0.4	0.6	1	0.5	0.369	24.768
8	0.3	0.7	1	0.5	0.411	28.896
9	0.2	0.8	1	0.5	0.489	33.024
10	0.1	0.9	1	0.5	0.570	37.152

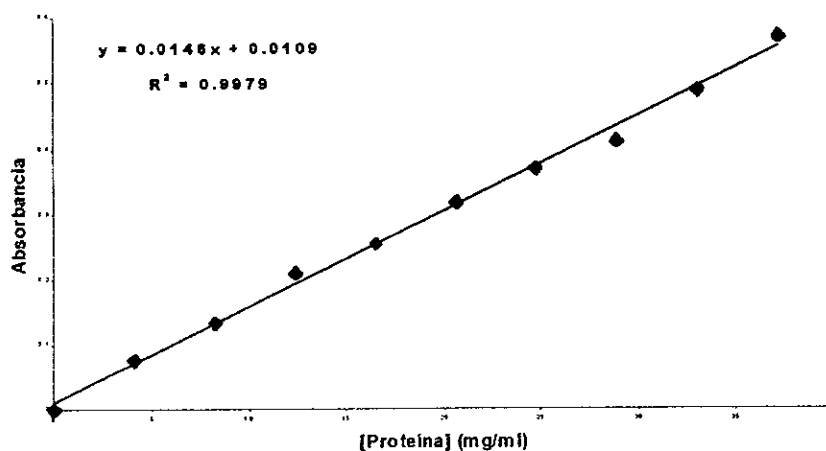


Fig. 38 Curva patrón de proteína en espectrofotómetro marca Perkin Elmer Modelo Lambda Bio 4335
 $\lambda = 750 \text{ nm}$

Curva patrón de azúcares reductores

Soln. de glucosa (1 mg/ml) (ml)	Agua destilada (ml)	Soln. de DNS (ml)	[Glucosa] (mg/ml)	Absorbancia
0	8	2	0	0
0.25	7.75	2	0.025	0.032
0.500	7.5	2	0.05	0.146
0.750	7.25	2	0.075	0.316
1	7	2	0.1	0.5026
1.25	6.75	2	0.125	0.665
1.5	6.5	2	0.15	0.849
1.75	6.25	2	0.175	1.045

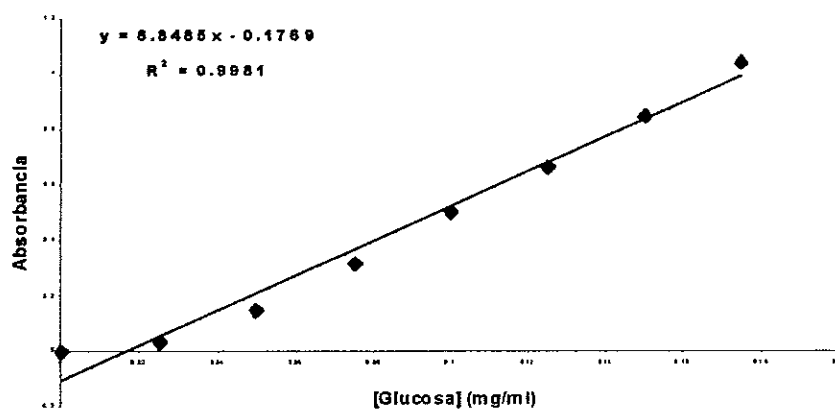


Fig. 39 Curva patrón de azúcares reductores en espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo Lambda Bio 4335
 $\lambda = 540 \text{ nm}$

10.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abee T, Krockel L, Hill C. (1995). "Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning". *Int. J. Food Microbiol.*, **28**,169-185
- 2) Achi OK.(1990). "Microbiology of 'obiolor': a Nigerian fermented non-alcoholic beverage". *J. Appl. Bact.*, **69**, :321-325.
- 3) Adams MR y Marteau P.(1995). "On the safety of lactic acid bacteria from food". *Int J Food Microbiol.*, **27**, 263-264.
- 4) Aderiye BI y Ogunjobi AA.(1998). "Fermentation of yam: microbiology and sensory evaluation of cooked fermented yam tissues". *Plant Foods Hum. Nutr.*, **52**, 49-54.
- 5) Aguilar M., García P., Mata P. y Pérez A., (1997). "Amilasas microbianas – aislamiento de microorganismos productores y estudio bioquímico de las enzimas". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, pag. 42.
- 6) Amoa-Awua WK, Appoh FE, Jakobsen M.(1996). "Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima". *Int. J. Food Microbiol.*, **31**, 87-98.
- 7) Ampe F, Ben Omar N y Guyot JP.(1999). "Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough". *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 131-140.
- 8) Ardhana MM y Fleet GH. (1989). "The microbial ecology of tape ketan fermentation". *Int. J. Food Microbiol.*, **9**, 157-165.
- 9) Batish VK, Roy U, Lal R, Grover S. (1997). "Antifungal attributes of lactic acid bacteria- a review". *Crit. Rev. Biotech.*, **17**, 209-225.
- 10) Beuchat, L. R., Nakayama, T., Phillips, R. D., y Worthington, R. E., (1985). "Comparison of soybeans, peanuts and cowpeas as substrates for preparing natto". *J. Ferment. Technol.*, **63**, 319.
- 11) Bothast, R. J. y Smiley, K. L., (1978). "Metabolites of fungi used in food processing, in *Food and Beverage Mycology*". Beuchat, L. R., Ed., AVI Publishing, Westport, C. T.

- 12) Boyer C. D. y Shannon J. C. (1987). "Carbohydrates of the kernel. En: Corn:". Chemistry and Technology. Watson S. A. y Ramstad P. E. (Eds). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, 253-272.
- 13) Brown I. (1996). "Complex carbohydrates and resistant starch". Nutr. Rev. **5(11)**, S115-119.
- 14) Cannel, E. & Moo-Young, M., (1980). "Solid-State fermentation systems". Process Biochem., 15, 2.
- 15) Caplice E y Fitzgerald GF.(1999). "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.". Int. J. Food Microbiol., **15:50 (1-2)**, 131-149.
- 16) Chavan JK y Kadam SS. (1989). "Nutritional improvement of cereals by fermentation". Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 349-400.
- 17) Cheigh HS, Park KY. (1994). "Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products)". Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **34**, 175-203.
- 18) Cooke RD, Twiddy DR & Reilly PJA (1987). "Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries". FEMS Microbiol. Rev., **46**, 369-379.
- 19) Cravioto R. O., Cravioto O. Y., Massieu H. G. y Guzmán g. G. J. (1955). "El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta". Ciencia México **15**, 27-30.
- 20) Cronk, T. C., Steinkraus, K. H., Hackler, L. R. & Mattick, L. R., (1977). "Indonesian tapé ketan fermentation". Appl. Env. Microbiol., **33**, 1067.
- 21) Cruz Ulloa S, y Ulloa. (1973). "Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos". Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural **24**, 423-457.
- 22) De Vuyst, L., Vandamme, E. J., (1994 a.) . "Antimicrobial potential of lactic acid bacteria". Blackie Academic and Professional, London, pp 152-221.
- 23) Díaz Ruiz (1996). "Metabolismo de carbohidratos de una bacteria láctica aislada del pozol". Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- 24) Difco Manual. 9th edition, USA, 1996, pag. 64 y 65.
- 25) Egan, H. (1987). "Análisis químico de alimentos de Pearson". Ed. Continental, México, pp. 22 y 23.

- 26) Escamilla-Hurtado M. L., Velásquez-Corona J. R., Virgen-García M- I., Oropeza-Beivide N. C., Vázquez-Osorno M.E., y Brouzes F. (1991). "Manual de Productos fermentados Tradicionales de Maíz". Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Instituto Nacional del Consumidor, Dirección General de Culturas Populares, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, 39 pp.
- 27) Fenemma, Owen R. (1993). "Química de los alimentos". Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 65-69, 130-134.
- 28) Fernández, R., Elías, L. G., Braham, J. E., & Bressani, R., (1982). "Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (*phaseolus vulgaris*) and their relationship with the content of tannins and associated polyphenols". J. Agr. Food Chem., **30**, 734.
- 29) Flores Espinoza T. (1996). "Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- 30) Flores Piña E. (1998). "Estudios sobre la acidificación de alimentos fermentados de maíz". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- 31) Fuentes I., Herrera T. y Ulloa M. (1974). "Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *napolitana* aisladas de pozol". Revista Latinoamericana de Microbiología **16**, 99-103.
- 32) Helrich K. (1990). "Isolation of biotechnological organisms from nature". Edit. MacGraw-Hill. Environmental Biotechnology series. USA, pp. 33-40, 56-58.
- 33) Halm M, Lillie A, Sorensen AK y Jakobsen M. (1993). "Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana". Int. J. Food Microbiol., **19**, 135-143.
- 34) Hanciogiu O y Karapinar M.(1997). "Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage". Int. J. Food Microbiol., **15;35**, 271-274.
- 35) Helbert, D, Almeida, Rooney y Lloyd. (1996). "Avances en la manufactura y calidad de productos de maíz nixtamalizado". Cereal Quality Laboratory, Soil and Crops Sciences. Texas A y M University, College Station, USA. Seminario.
- 36) Holzapfel WH, Gelsen R y Schillinger U.(1995). "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes". Int. J. Food Microbiol., **24**, 343-362.

- 37) Hugenholtz Jeroen, Kleerebezem M. (1999). "Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations". *Curr. Op. Biotech.*, **10(5)**, 492-497.
- 38) Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. (1992). "Tablas de uso práctico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México". Comisión Nacional de Alimentación, 2ª. Edición. México, pp. 1A y 1B.
- 39) Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B., (1995). "Bacteriocins of gram positive bacteria". *Microbiol. Rev.*, **59**, 171-200.
- 40) Jay, J. M., (1986). "Modern Food Microbiology". Van Nostrand Reinhold, New York.
- 41) Jay, J. M., (1996). "Modern food Microbiology". 5th Edition, Chapman and Hall, New York.
- 42) Jespersen L, Halm M, Kpodo K, Jakobsen M. (1994). "Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for 'kenkey' production". *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 239-248.
- 43) Kontula P, von Wright A, Mattila-Sandholm T. (1998). "Oat bran beta-gluco- and xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for lactic acid bacteria". *Int. J. Food Microbiol.*, **45**, 163-169.
- 44) Kandler O. (1983). "Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria". *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.
- 45) Leisner JJ, Pot B, Christensen H, Rusul G, Olsen JE, Wee BW, Muhamad K, Ghazali HM. (1999). "Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient". *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 599-605.
- 46) Liem, I. T. H., Steinkraus, K. H., & Cronk, T. C., (1977). "Production of Vitamin B₁₂ in tempeh, a fermented soybean food". *Appl. Env. Microbiol.*, **34**, 773.
- 47) Lindgren SE, Dobrogosz WJ. (1990). "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations". *FEMS Microbiol. Rev.*, **7**, 149-163.
- 48) Lion, A. (1983). "Proteolytic systems in lactic acid bacteria". *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 225-245.
- 49) Marvin, L. S., (1984). "Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods". American Public Health Association, 2nd edition. Washington d. C., USA, 1984, pags. 176-181, 848.

- 50) Naqbors, L., Gerald, R. C. (1986). "Alternative sweeteners". Edit. Marcel Dekker. USA, pp. 9-11.
- 51) Nieto E. y Vázquez E. (1993). "Las fermentaciones tradicionales del maíz. Resultados de una encuesta". Alimentos fermentados Indígenas de México. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 47-51.
- 52) Nout MJ.(1992). "Accelerated natural lactic fermentation of cereal-based formulas at reduced water activity". Int. J. Food Microbiol., **16(4)**, 313-322.
- 53) Nout MJ.(1991). "Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas". Int. J. Food Microbiol., **12(2-3)**, 217-224.
- 54) Nout MJ, Sarkar PK.(1999). "Lactic acid food fermentation in tropical climates". Antonie Van Leeuwenhoek **76(1-4)**, 395-401.
- 55) Nout MJR & Motarjemi Y. (1997). "Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop". Food Control **8**, 221-226.
- 56) Nuraida L. (1988). "Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough." MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 237 pp.
- 57) Nwosu CD, Ojmelukwe PC.(1993). "Improvement of the traditional method of ogiri production of the micro-organisms associated with the fermentation process". Plant Foods Hum. Nutr., **43(3)**, 267-272.
- 58) The Merck Index. Published by Merck Research Laboratories, (1996), Merck & Co. New Jersey, 20th edition. USA, pp.113.
- 59) Olsen A, Halm M, Jakobsen M.(1995). "The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation". Journal of Appl. Bacter., **79(5)**, 506-512.
- 60) Oteng-Gyangk, Moulin G, Galzy P.(1981). "A study of amyolytic system of *Schwanniomyces castelli*". Z Allg Mikrobiology **21(7)**, 537-544.
- 61) Paredes-Lopez O, Harry GI. (1988). "Food biotechnology review: traditional solid-state fermentations of planta raw materials—application, nutritional significance, and future prospects". Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **27(3)**, 159-187.

- 62) Pellet, P. L. & Young, V. R. (1980). "Nutritional Evaluation of Protein Foods". United Nations University, Tokyo.
- 63) Ramírez J. F. (1987). "Biochemical studies on a Mexican fermented corn food—pozol". PhD thesis, Faculty of the Graduate School, Cornell University, N. York, 176 pp.
- 64) Ray, B. (1993). "Sublethal injury, bacteriocins and food microbiology". *ASM News* **59**, 285-291.
- 65) Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. (1982). "Legume-based fermented foods: their preparation and nutritional quality". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **17(4)**, 335-370.
- 66) Robelo C. A. (1904). "Diccionario de Aztequismos, o sea, Catálogo de las palabras del idioma nahuatl, azteca o mexicano, introducidas al idioma castellano bajo diversas formas." . Imprenta del autor, México.
- 67) Robelo C. A.. (1948). "Diccionario de Aztequismos." . Ediciones Fuente Cultural, México.
- 68) Ross RP, Galvin M, McAullffe O, Morgan SM, Ryan MP, Twomey DP, Meaney WJ, Hill C . (1999). "Developing applications for lactococcal bacteriocins" .*Antonie Van Leeuwenhoek* **76(1-4)**, 337-346.
- 69) Rusell JB, Diez-Gonzalez F.(1998)., "The efectos of fermentation acids on bacterial growth". *Adv. Microbiol. Physiol.*, 205-234.
- 70) Sainz Espuñes (1998). "Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol". Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- 71) Salinas Ch. C. (1958). "Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol." . Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63 pp.
- 72) Sanni AI. (1993). "The need for process optimization of African fermented foods and beverages". *Int. J. Food Microbiol.*, **18(2)**, 85-95.
- 73) Santamaría F. J. (1978). "Diccionario de Mejicanismos." . Tercera Edición. Editorial Porrúa, México.

- 74) Santillana Hinojosa R. (1995). "Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol". Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- 75) Silva-Villarreal E. C. (1984). "Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas.". Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, 44 pp.
- 76) Steinkraus KH. (1983). "Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes". *Antonie Van Leeuwenhoek* **49(3)**, 337-348.
- 77) Steinkraus KH. (1983). "Indonesian tempeh and related fermentations". *Handbook of Indigenous Fermented Foods, Microbiology Series*, **9**
- 78) Stiles ME, Holzapfel WH. (1997). "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy". *Int. J. Food Microbiol.*, **36(1)**, 1-29.
- 79) Sutardi & Bucle, K. A., (1985). "Reduction in phytic acid levels in soybeans during tempeh production, storage and frying". *J. Food Sci.*, **50**, 260.
- 80) Ulloa M. y Herrera T. (1972). "Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*." *Revista Latinoamericana de Microbiología* **14**, 15-24.
- 81) Ulloa M. (1974). "Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México" *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* **8**, 17-48.
- 82) Ulloa M. Y Herrera T. (1976-1982). "Estado actual del conocimientos sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesguino, pulque, colonche y tepache." . *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* **47-53**. Serie Botánica, 145-163.
- 83) Ulloa M., Herrera T y Taboada J. (1983). "Mexican pozol.". *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K. H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, pp 226-233.
- 84) Ulloa M., Herrera T. Y Lappe P. (1987). "Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México". *Serie de Investigaciones Sociales No. 16*, Instituto Nacional Indigenista, México, pp 13-20.
- 85) Valderrama P. y Ramírez C. (1993). "Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla.". *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. M. C. Wachter y P. Lappe (Compiladoras). Universidad Nacional Autónoma de México, pp 63-67.

- 86) Vaughan EE, Caplice E, Looney R, O'Rourke N, Coveney H, Daly C, Fitzgerald GF. (1994). "Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials". J. Appl. Bacter., **76(2)**, 118-123.
- 87) Vogel RF, Knorr R, Muller MR, Steudel U, Ganzle MG, Ehrmann MA. (1999). "Non-dairy lactic fermentations: the cereal world". Antonie Van Leeuwenhoek **76(1-4)**, 403-411.
- 88) Vos WM. (1996). "Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria". Antonie Van Leeuwenhoek **70(2-4)**, 223-242.
- 89) Wachter Rodarte (1995). "Estudios sobre la microbiología del Pozol". Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos). Facultad de Química, UNAM.
- 90) Wagenknecht, A.C., Mattick, L. R., Lewin, L. M., Hand, D. B. & Steinkraus, KH. (1983). "Changes in soybean lipids during tempeh fermentation". J. Food Sci., **26**, 373.
- 91) Wang, H. L., Ruttel, D. I., & Hesseltine, C. W., (1968). "Protein quality of wheat and soybean after *Rhizopus oligosporus* fermentation.". J. Nutr., **96**, 109.
- 92) Watson, S. A. y P. E. Ramstad. (1987). "Corn: Chemistry and Technology". American Association of Cereal Chemists, pag. 133.